

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-009854

(43)Date of publication of application : 14.01.2003

---

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
A61K 35/12  
A61K 35/14  
A61K 35/22  
A61K 35/30  
A61K 35/32  
A61K 35/34  
A61K 35/36  
A61K 35/37  
A61K 35/39  
A61K 35/407  
A61K 35/42  
A61K 35/48  
A61K 35/55  
A61K 45/00  
A61P 1/00  
A61P 1/04  
A61P 1/16  
A61P 1/18  
A61P 3/10  
A61P 5/14  
A61P 5/18  
A61P 7/00  
A61P 7/02  
A61P 9/00  
A61P 9/04  
A61P 9/10  
A61P 9/12  
A61P 11/00  
A61P 11/06  
A61P 13/00  
A61P 13/12  
A61P 15/00  
A61P 15/08  
A61P 17/00  
A61P 17/02  
A61P 17/06

A61P 19/00  
A61P 19/02  
A61P 19/08  
A61P 19/10  
A61P 21/00  
A61P 21/04  
A61P 25/08  
A61P 25/14  
A61P 25/16  
A61P 25/28  
A61P 27/02  
A61P 27/16  
A61P 29/00  
A61P 31/04  
A61P 31/18  
A61P 31/20  
A61P 37/02  
A61P 37/08  
C12N 5/02  
G01N 33/15  
G01N 33/50

---

(21)Application number : 2002-106737

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD  
HIRAOKA ATSUNOBU

(22)Date of filing : 09.04.2002

(72)Inventor : HIRAOKA ATSUNOBU  
SATO MITSUO  
SUGIMOTO SEIJI

---

(30)Priority

Priority number : 2001110100 Priority date : 09.04.2001 Priority country : JP

---

(54) METHOD FOR EMBRYOID BODY FORMATION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for forming an embryoid body from an embryonic stem cell, with which an embryoid body can be stably formed in high efficiency even by using either a serum medium or a serum-free or even at a relatively low density of an embryonic stem cell, a method for differentiating and inducing a functional cell usable for cell and organ transplantation medical treatment from an embryonic stem cell, to obtain a medium and a differentiation inducer useful for the method, the differentiation-induced cell and to

provide a method for use thereof.

SOLUTION: This method for forming an embryoid body from an embryonic stem cell is characterized by comprising a process for culturing an embryonic stem cell using a medium containing a specific factor. This medium is used for the method. This differentiation inducer is used for the method. This method for differentiated cell induction using the method is provided. The differentiation- induced cell is obtained. This method for use thereof is provided.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-9854

(P2003-9854A)

(43) 公開日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	7-73-1*(参考)
C 1 2 N 5/06	Z N A	A 6 1 K 35/12	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/12		35/14	4 B 0 6 5
35/14		35/22	4 C 0 8 4
35/22		35/30	4 C 0 8 7
35/30		35/32	

審査請求 未請求 請求項の数52 O L (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-106737(P2002-106737)	(71) 出願人	000001029 協和発酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 出願日	平成14年4月9日(2002.4.9)	(71) 出願人	596143495 平岡 篤信 京都府京都市右京区嵯峨二尊院門前北中院 町27番地34号
(31) 優先権主張番号	特願2001-110100(P2001-110100)	(72) 発明者	平岡 篤信 京都府京都市右京区嵯峨二尊院門前北中院 町27番地34号
(32) 優先日	平成13年4月9日(2001.4.9)	(74) 代理人	100105647 弁理士 小栗 昌平 (外4名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンブリオイドボディ形成方法及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 血清培地、無血清培地のいずれを用いても、また胚性幹細胞の密度が比較的低くとも、高効率で安定的にエンブリオイドボディを形成できる、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法を提供すること。さらに細胞及び臓器移植医療に利用可能である機能性細胞を胚性幹細胞から分化誘導する方法、該方法のために用いる培地及び分化誘導剤、該分化誘導した細胞、並びにこれらの利用方法を提供すること。

【解決手段】 胚性幹細胞を、特定の因子を含む培地を用いて培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法、該方法のために用いるための培地及び分化誘導剤、該方法を用いた分化細胞の誘導方法、該分化誘導した細胞、並びにそれらの利用。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 胚性幹細胞を造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) を含む培地を用いて培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法。

【請求項2】 該培地が血清を含む培地である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該培地がさらに細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である請求項1に記載の方法。

【請求項4】 該培地がさらに骨形成因子4 (bone morphogenetic protein4) を含む培地である請求項3に記載の方法。

【請求項5】 胚性幹細胞を骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) および細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法。

【請求項6】 該培地が白血病阻害因子 (leukaemia inhibitory factor) を含まない培地である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 細胞外マトリックス蛋白質が以下の (a)、(b)、(c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である請求項3～6のいずれか1項に記載の方法。

- (a) ゼラチン (gelatin) ;
- (b) ラミニン (laminin) ;
- (c) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;
- (d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (e) フィブロネクチン (fibronectin) 。

【請求項8】 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチン (fibronectin) である請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該培地がさらに以下の (a)、(b)、(c)、(d) からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である請求項1、2および6のいずれか1項に記載の方法。

- (a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor) ;
- (b) flk-2/flt3 リガンド (flk-2/flt3 ligand) ;
- (c) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (d) トロンボポイエチン (thrombopoietin) 。

【請求項10】 該培地がさらに以下の (a)、(b)、(c)、(d) からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である請求項3、4、6～8のいずれか1項に記載の方法。

- (a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor) ;
- (b) flk-2/flt3 リガンド (flk-2/flt3 ligand) ;
- (c) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (d) トロンボポイエチン (thrombopoietin) 。

【請求項11】 該培地が、細胞外マトリックス蛋白

質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) および造血幹細胞因子 (stem cell factor) を含む培地である請求項10に記載の方法。

【請求項12】 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor)、flk-2/flt3 リガンド (flk-2/flt3 ligand)、インターロイキン3 (interleukin 3) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地である請求項10に記載の方法。

【請求項13】 細胞外マトリックス蛋白質が以下の (a)、(b)、(c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である請求項10～12のいずれか1項に記載の方法。

- (a) ゼラチン (gelatin) ;
- (b) ラミニン (laminin) ;
- (c) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;
- (d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (e) フィブロネクチン (fibronectin) 。

【請求項14】 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチンである請求項13に記載の方法。

【請求項15】 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を培養する工程で、培養する細胞の濃度が2500細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする請求項7または8に記載の方法。

【請求項16】 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を培養する工程で、培養する細胞の濃度が2000細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする請求項10～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を培養する工程で、培養する細胞の濃度が1500細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする請求項10～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を4日間以上培養する工程を含むことを特徴とする、請求項3～8、10～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法を工程として含む胚性幹細胞より分化細胞を誘導する方法。

【請求項20】 分化細胞が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる細胞である、請求項19に記載の方法。

- (a) 外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞 ;
- (b) 中胚葉細胞または中胚葉由来の細胞 ;
- (c) 内胚葉細胞または内胚葉由来の細胞。

【請求項21】 外胚葉由来の細胞が神経組織、松果体、副腎髄質、色素体および表皮組織からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 中胚葉由来の細胞が筋組織、結合組

織、骨組織、軟骨組織、循環器、血液組織、真皮、泌尿器および生殖器官からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 内胚葉由来の細胞が、消化管、呼吸器、胸腺、甲状腺、副甲状腺、膀胱、中耳、肝臓および脾臓からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項24】 さらに以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)、(l)、(m)、(n)、(o)、(p)、(q)及び(r)からなる群から選ばれる因子を単独あるいは複数含む培地を用いて培養することを特徴とする、請求項19～23のいずれか1項に記載の方法。

- (a) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (b) トロンボポイエチン (thrombopoietin) ;
- (c) 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) ;
- (d) エリスロポイエチン (erythropoietin) ;
- (e) インターロイキン6 (interleukin 6) ;
- (f) インターロイキン11 (interleukin 11) ;
- (g) アクチビンA (activin A) ;
- (h) 骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) ;
- (i) 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) ;
- (j) インターロイキン1 (interleukin 1) ;
- (k) マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor) ;
- (l) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ;
- (m) インターロイキン7 (interleukin 7) ;
- (n) インターロイキン2 (interleukin 2) ;
- (o) トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor-β) ;
- (p) 神経成長因子 (nerve growth factor) ;
- (q) レチノイン酸 (retinoic acid) ;
- (r) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) 。

【請求項25】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清、インターロイキン3 (interleukin 3)、エリスロポイエチン (erythropoietin)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、請求項22に記載の方法。

【請求項26】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清およびインターロイキン7 (interleukin 7) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、請求項22に記載の方

法。

【請求項27】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、請求項22に記載の方法。

【請求項28】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清、インターロイキン3 (interleukin 3)、エリスロポイエチン (erythropoietin)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、胚性幹細胞より造血幹細胞を誘導する方法。

【請求項29】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清およびインターロイキン7 (interleukin 7) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、胚性幹細胞よりB細胞を誘導する方法。

【請求項30】 請求項1～18に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、胚性幹細胞より血管内皮細胞を誘導する方法。

【請求項31】 胚性幹細胞が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる細胞である、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

- (a) 初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；
- (b) 体細胞の核を移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；
- (c) (a)又は(b)の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

【請求項32】 請求項1～4、6～18のいずれか1項に記載の方法で用いる、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) を含む胚性幹細胞を培養するための培地。

【請求項33】 該培地がさらに血清を含む請求項32に記載の培地。

【請求項34】 該培地がさらに細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である請求項32に記載の培地。

【請求項35】 該培地がさらに骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) を含む請求項34に記載の培地。

【請求項36】 請求項5記載の方法で用いる、骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) および細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である胚性幹細胞を培養するための培地。

【請求項37】 該培地が白血病阻害因子 (leukaemia inhibitory factor) を含まない培地である請求項32

～36のいずれか1項に記載の培地。

【請求項38】 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である請求項34～37のいずれか1項に記載の培地。

- (a) ゼラチン (gelatin) ;
- (b) ラミニン (laminin) ;
- (c) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;
- (d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (e) フィブロネクチン (fibronectin) ;

【請求項39】 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチン (fibronectin) である請求項38に記載の培地。

【請求項40】 該培地がさらに以下の(a)、

(b)、(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である請求項32、33または37に記載の培地。

- (a) 造血幹細胞増殖因子 (stem cell factor) ;
- (b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand) ;
- (c) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (d) トロンボポイエチン (thrombopoietin) ;

【請求項41】 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) および以下の(a)、(b)、(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である請求項34、35および37～39のいずれか1項に記載の培地。

- (a) 造血幹細胞増殖因子 (stem cell factor) ;
- (b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand) ;
- (c) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (d) トロンボポイエチン (thrombopoietin) ;

【請求項42】 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) および造血幹細胞増殖因子 (stem cell factor) を含む培地である請求項41に記載の培地。

【請求項43】 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor)、flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand)、インターロイキン3 (interleukin 3) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地である請求項41に記載の培地。

【請求項44】 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である請求項41～43に記載の培地。

- (a) ゼラチン (gelatin) ;
- (b) ラミニン (laminin) ;
- (c) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;

- (d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (e) フィブロネクチン (fibronectin) ;

【請求項45】 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチンである請求項44に記載の培地。

【請求項46】 造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) を有効成分として含む胚性幹細胞から分化細胞を誘導するための分化誘導剤。

【請求項47】 さらに以下の(a)～(y)からなる群から選ばれる少なくとも一つの因子を有効成分として含む請求項46に記載の分化誘導剤。

- (a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor) ;
- (b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand) ;
- (c) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (d) トロンボポイエチン (thrombopoietin) ;
- (e) 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) ;
- (f) エリスロポイエチン (erythropoietin) ;
- (g) インターロイキン6 (interleukin 6) ;
- (h) インターロイキン11 (interleukin 11) ;
- (i) アクチビンA (activin A) ;
- (j) 骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) ;
- (k) 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) ;
- (l) インターロイキン1 (interleukin 1) ;
- (m) マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor) ;
- (n) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ;
- (o) インターロイキン7 (interleukin 7) ;
- (p) インターロイキン2 (interleukin 2) ;
- (q) トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor-β) ;
- (r) 神経成長因子 (nerve growth factor) ;
- (s) レチノイン酸 (retinoic acid) ;
- (t) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) ;
- (u) ゼラチン (gelatin) ;
- (v) ラミニン (laminin) ;
- (w) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;
- (x) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (y) フィブロネクチン (fibronectin) ;

【請求項48】 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法により得られるエンブリオイドボディ。

【請求項49】 請求項19～31のいずれか1項に記載の方法を用いることにより誘導される分化細胞。

【請求項50】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法を用い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程を比較することを特

微とする、胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程における調節に関する物質の評価方法。

【請求項51】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項1〜31のいずれか1項に記載の方法を用い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程における調節に関する物質のスクリーニング方法。

【請求項52】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項49に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化した細胞の機能を比較することを特徴とする、該分化細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

【請求項53】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項49に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化した細胞の機能を比較することを特徴とする、該分化細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

【請求項54】 請求項46または47に記載の分化誘導剤を含む医薬。

【請求項55】 請求項49に記載の分化細胞を含む医薬。

【請求項56】 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および/または治療のための医薬である、請求項54または55に記載の医薬。

(a) 外胚葉由来の細胞；

(b) 中胚葉由来の細胞；

(c) 内胚葉由来の細胞。

【請求項57】 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経組織、松果体、副腎髄質、色素細胞および表皮組織からなる群から選ばれる部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である、請求項56に記載の医薬。

【請求項58】 中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、筋組織、結合組織、骨組織、軟骨組織、循環器、血液組織、真皮、泌尿器および生殖器からなる群から選ばれる部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である、請求項56に記載の医薬。

【請求項59】 内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、消化管、呼吸器、肺臓、甲状腺、副甲状腺、膀胱、中耳、肝臓および脾臓からなる群から選ばれる部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である、請求項56に記載の医薬。

【請求項60】 神経組織を構成する細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、ダウン症候群、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経外傷または神経毒物の障害に起因する疾患であり、松果体を構成する細胞の障害に基づく疾患が松果体症または松果体機能不全であり、副腎髄質を構成する細胞の障害に基づく疾患

が副腎機能欠如症または副腎炎であり、色素細胞の障害に基づく疾患が色素異常症または色素過剰症であり、表皮組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床ずれ、皮膚炎、表皮症または乾せんである、請求項57に記載の医薬。

【請求項61】 筋組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が筋肉不全症、筋緊張症または重症筋無力症であり、結合組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が結合組織病、結合組織炎または糖尿病であり、骨組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が骨粗鬆症、骨関節炎、骨形成異常症、骨硬化症、骨髄炎または骨形成不全症であり、軟骨組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が変形関節炎、慢性関節リウマチ、軟骨形成不全症、軟骨發育不全症または軟骨形成異常症であり、循環器を構成する細胞の障害に基づく疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、SLE、狭心症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、再狭窄、血栓、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または肺循環障害であり、血液組織を構成する細胞の障害に基づく疾患がHIV感染、敗血症、移植片対一宿主疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、真皮を構成する細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、皮膚炎または乾せんであり、泌尿器を構成する細胞の障害に基づく疾患が溶血性尿毒症症候群または腎炎であり、生殖器を構成する細胞の障害に基づく疾患が性器發育不全症または性器發育異常である、請求項58に記載の医薬。

【請求項62】 消化管を構成する細胞の障害に基づく疾患が胃潰瘍、胃炎または十二指腸潰瘍であり、呼吸器を構成する細胞の障害に基づく疾患が肺気腫、肺水腫、肺炎、気管支炎または気管支喘息であり、肺臓を構成する細胞の障害に基づく疾患が肺臓炎、胸腺リンパ形成不全症または胸腺機能減退症であり、甲状腺を構成する細胞の障害に基づく疾患が甲状腺無形成症または甲状腺機能不全症であり、副甲状腺を構成する細胞の障害に基づく疾患が副甲状腺機能低下症であり、膀胱を構成する細胞の障害に基づく疾患が膀胱炎または膀胱破裂であり、中耳を構成する細胞の障害に基づく疾患が中耳炎であり、肝臓を構成する細胞の障害に基づく疾患が肝臓萎縮症、慢性B型肝炎またはC型肝炎であり、脾臓を構成する細胞の障害に基づく疾患が糖尿病である、請求項59に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法、及び/又は胚性幹細胞から機能性細胞を分化誘導する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、血清培地、無血清培地のいずれを用いても、また胚性幹細胞の密度が比較的低くとも、高効率で安定的にエンブリオイドボディを形成する方



法。さらには分化細胞を誘導可能な胚性幹細胞の培養方法。該方法のために用いる培地及び分化誘導剤。該分化誘導した細胞。並びにそれらの利用法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】胚性幹細胞 (embryonic stem cell) とは、インビトロ (in vitro) において培養することが可能で、かつ、他の個体の着床以前の胚、例えば、胚盤腔中に注入すると生殖細胞をも含むすべての細胞に分化できる細胞である。

【0003】胚性幹細胞は胚幹細胞あるいはES細胞とも呼ばれ、胚盤腔の内部に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊を構成している細胞を培養に移し、頻繁に細胞塊の解離と継代を繰り返すことで樹立できる。この細胞は正常核型を維持しながらほぼ無限に増殖と継代を繰り返すことが可能であり、内部細胞塊と同じようにあらゆる種類の細胞に分化することができる多分化能を保つことが知られている。以下、本明細書においてES細胞と記載した場合は、胚性幹細胞のうち、胚盤腔の内部細胞塊より樹立された狭義の胚性幹細胞をさすものとする。

【0004】胚盤腔の内部細胞塊を通常の初代培養のように培養すると、ほとんどの場合、直に上皮様細胞に分化してしまう。しかし、胎児から調整した初代繊維芽細胞やS1H1マウス由来のSTO細胞などをフィーダー細胞として用い (Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社 (1995))、フィーダー細胞の上で適切な細胞密度を保ち、頻繁に培養液を交換しながら細胞の解離と継代を繰り返すことで未分化幹細胞の性質を保持したまま未分化状態を維持することが可能となる (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994))。ES細胞の未分化状態を維持する因子として白血病阻害因子 (leukaemia inhibitory factor; 以下LIFとも略す) が同定されており (A. G. Smith and M. L. Hooper; Dev. Biol., 121, 1, 1987; A. G. Smithら; Nature, 335, 688, 1988; P. D. Rathjenら; Genes Dev., 4, 2308, 1990)、培養液中にLIFを添加することによって、フィーダー細胞を用いなくても全能性をもつES細胞を単離し培養することが可能となることが報告されている (J. Nicholsら; Development, 110, 1341, 1990; S. Peaseら; Dev. Biol., 141, 344, 1990)。

【0005】ES細胞を、ES細胞と同系統の動物の皮下などに移植すると、様々な組織が混ざり合った奇形腫が形成されることが知られている (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994))。しかしながら、インビトロの培養において、ES細胞を単離さ

せ、いったん疑似胚状態にしたエンブリオイドボディと呼ばれる細胞塊 (embryoid body; 以下、EBとも略す) を形成させることによって分化を誘導し、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、グリア細胞、神経細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイト、脂肪細胞など様々な各種分化細胞を出現させることが可能であることが報告されている (G. M. Keller; Curr. Opin. Cell Biol., 7, 862, 1995; P. D. Rathjenら; Reprod. Fertil. Dev., 10, 31, 1998; C. Damら; J. Cell Sci., 110, 1279, 1997; S.-H. Leeら; Nat. Biotechnol., 18, 675, 2000)。

【0006】通常、ES細胞からのEBの形成は、LIFおよび10~20%のウシ胎児血清を含む培地中で未分化状態で維持増殖させたES細胞を、トリプシン-EDTA処理等ではらばらにした後、培養ディッシュに付着しないように、何もコートしていないプラスチックディッシュ上で、LIFを除いた10~20%のウシ胎児血清を含む培地を用いて培養することにより行われている。EBの形成は培地中に含まれる血清のロットによって左右されることが経験的に知られており、血清中の何らかの因子がES細胞からのEBの形成に影響を与えていることが示唆されている。このような因子の同定は未だなされておらず、無血清培養状態でES細胞の分化増殖を維持し、効率的にEBを形成させることは難しい。ジョハンソン (Johansson) らは蛋白成分としてインスリン、トランスフェリン、アルブミンを含有する無血清培地を用いてEBの形成を試み、5,000個/mLの細胞密度で細菌培養用の培養器にES細胞を播種した結果、約10~20個のEBの形成が観察されるが72時間以内に死滅してしまうことを報告している (B. M. Johansson & M. V. Wiles; Mol. Cell. Biol., 15, 141, 1995)。この際、極微量のLIFの添加は生存率の延長に有効だが長期の維持は難しい。また、彼らは、無血清培地を用いてEBを形成させ分化を誘導する場合には播種細胞密度が重要であり、10,000個/mL以上の細胞密度ではES細胞の分化が阻害されることを明らかにしている。

【0007】最近、血清代替物として20%ノックアウトSR (ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies) 社製) を含有する培地中で、ES細胞からEBを形成させたとする報告 (M. Schuldinerら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 11307, 2000) がなされたが、100mm径のプレートあたり10'個、すなわち約1,000,000個/mLという高密度でES細胞を使用しており、効率的な分化誘導には成功していない。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】以上のような背景から、多分化能を保持したまま培養可能な未分化幹細胞から目的とする機能性細胞を選択的に、かつ効率的に分化

誘導するための方法の開発が注目され様々な試みがなされている。またその際、細胞医療の観点から、目的とする機能細胞を人為的にコントロールされた環境下、例えば、血清を用いない培養条件で誘導する方法の開発が望まれている。しかしながら、胚性幹細胞を様々な機能性細胞に分化させる為に重要なステップであるEBの形成のメカニズムには不明な点が多く残されており、血清を用いない培養状態で効率的にEBを誘導する方法は開発されていない。無血清条件下で効率的に、かつ長期間培養できるEBの形成が可能になれば、あるいは、血清を用いる場合でも血清のロットに左右されず効率的に、かつ長期間培養できるEBの形成が可能になれば、様々な機能細胞の分化機構のより詳細な解析及び機能細胞自身の供給が可能になり、細胞医療や再生医療に有用である。

【0009】そこで本発明では、上述の課題を踏まえ、血清培地、無血清培地のいずれを用いても、また胚性幹細胞の密度が比較的低くとも、高効率で安定的にEBを形成できる、胚性幹細胞からEBを形成する方法を提供すること、さらに、細胞及び臓器移植医療に利用可能である機能性細胞を胚性幹細胞から分化誘導する方法、該方法のために用いる培地及び分化誘導剤、該分化誘導した細胞、並びにこれらの利用方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、胚性幹細胞の分化を引き起こす様々な培養条件を鋭意検討した結果、無血清培養条件及び/又は血清培養条件で胚性幹細胞からEBを効率的に形成する方法、それを用いた、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来の細胞を分化誘導する効率的な方法を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。

【0011】即ち、本発明は、以下の(1)～(62)に関する。

(1) 胚性幹細胞を造血幹細胞増殖因子(stem cell growth factor)を含む培地を用いて培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法。

(2) 該培地が血清を含む培地である(1)に記載の方法。

(3) 該培地がさらに細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である(1)に記載の方法。

(4) 該培地がさらに骨形成因子4(bone morphogenetic protein 4)を含む培地である(3)に記載の方法。

【0012】(5) 胚性幹細胞を骨形成因子4(bone morphogenetic protein 4)および細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞からエンブリオイドボディを形成する方法。

(6) 該培地が白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor)を含まない培地である(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法。

(7) 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)および(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である(3)～(6)のいずれか1項に記載の方法。

(a)ゼラチン(gelatin)；

(b)ラミニン(laminin)；

10 (c)コラーゲンタイプI(collagen type I)；

(d)コラーゲンタイプIV(collagen type IV)；

(e)フィブロネクチン(fibronectin)。

【0013】(8) 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチン(fibronectin)である(7)に記載の方法。

(9) 該培地がさらに以下の(a)、(b)、

(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である(1)、(2)および(6)のいずれか1項に記載の方法。

20 (a)造血幹細胞因子(stem cell factor)；

(b)f1k-2/f1t3リガンド(f1k-2/f1t3 ligand)；

(c)インターロイキン3(interleukin 3)；

(d)トロンボポイエチン(thrombopoietin)。

【0014】(10) 該培地がさらに以下の(a)、(b)、(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である(3)、(4)、(6)～(8)のいずれか1項に記載の方法。

(a)造血幹細胞因子(stem cell factor)；

30 (b)f1k-2/f1t3リガンド(f1k-2/f1t3 ligand)；

(c)インターロイキン3(interleukin 3)；

(d)トロンボポイエチン(thrombopoietin)。

(11) 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子(stem cell growth factor)および造血幹細胞因子(stem cell factor)を含む培地である(10)に記載の方法。

(12) 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子(stem cell growth factor)、f1k-2/f1t3リガンド(f1k-2/f1t3 ligand)、インターロイキン3(interleukin 3)およびトロンボポイエチン(thrombopoietin)を含む培地である(10)に記載の方法。

【0015】(13) 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)および(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である(10)～(12)のいずれか1項に記載の方法。

(a)ゼラチン(gelatin)；

(b)ラミニン(laminin)；

50 (c)コラーゲンタイプI(collagen type I)；

(d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;  
 (e) フィブロンネクチン (fibronectin) .  
 (14) 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロンネクチンである(13)に記載の方法。

【0016】(15) 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を播種する工程で、播種する細胞の濃度が2500細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする(7)または(8)に記載の方法。

(16) 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を播種する工程で、播種する細胞の濃度が2000細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする(10)～(14)のいずれか1項に記載の方法。

(17) 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を播種する工程で、播種する細胞の濃度が1500細胞/mL以上の細胞濃度であることを特徴とする(10)～(14)のいずれか1項に記載の方法。

(18) 該培地が無血清培地であり、胚性幹細胞を4日間以上培養する工程を含むことを特徴とする、(3)～(8)、(10)～(17)のいずれか1項に記載の方法。

【0017】(19) (1)～(18)のいずれか1項に記載の方法を工程として含む胚性幹細胞より分化細胞を誘導する方法。

(20) 分化細胞が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる細胞である、(19)に記載の方法。

- (a) 外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞；
- (b) 中胚葉細胞または中胚葉由来の細胞；
- (c) 内胚葉細胞または内胚葉由来の細胞。

(21) 外胚葉由来の細胞が神経組織、松果体、副腎髄質、色素体および表皮組織からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、(20)に記載の方法。

(22) 中胚葉由来の細胞が筋組織、結合組織、骨組織、軟骨組織、循環器、血液組織、真皮、泌尿器および生殖器からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、(20)に記載の方法。

(23) 内胚葉由来の細胞が、消化管、呼吸器、胸腺、甲状腺、副甲状腺、膀胱、中耳、肝臓および脾臓からなる群から選ばれる部位を構成する細胞である、(20)に記載の方法。

【0018】(24) さらに以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)、(l)、(m)、(n)、(o)、(p)、(q)及び(r)からなる群から選ばれる因子を単独あるいは複数含む培地を用いて培養することを特徴とする、(19)～(23)のいずれか1項に記載の方法。

- (a) インターロイキン3 (interleukin 3) ;
- (b) トロンボポイエチン (thrombopoietin) .
- (c) 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth

h factor) ;

(d) エリスロポイエチン (erythropoietin) ;

(e) インターロイキン6 (interleukin 6) ;

(f) インターロイキン11 (interleukin 11) ;

(g) アクチビンA (activin A) ;

(h) 骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) ;

(i) 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) ;

(j) インターロイキン1 (interleukin 1) ;

(k) マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor) ;

(l) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ;

(m) インターロイキン7 (interleukin 7) ;

(n) インターロイキン2 (interleukin 2) ;

(o) トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor-β) ;

(p) 神経成長因子 (nerve growth factor) ;

(q) レチノイン酸 (retinoic acid) ;

(r) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) .

【0019】(25) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清、インターロイキン3 (interleukin 3)、エリスロポイエチン (erythropoietin)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、(22)に記載の方法。

(26) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清およびインターロイキン7 (interleukin 7) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、(22)に記載の方法。

(27) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、(22)に記載の方法。

【0020】(28) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清、インターロイキン3 (interleukin 3)、エリスロポイエチン (erythropoietin)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、胚性幹細胞より造血幹細胞を誘導する方法。

(29) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清およびインターロイキン7 (interleukin 7) を含む培地を用いて培養することを特徴とする、胚性幹細胞よりB細胞を誘

10

20

30

40

50

導する方法。

(30) (1)～(18)に記載の方法で形成したエンブリオイドボディに由来する細胞を、血清および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) を含む培地を用いて培養することとを特徴とする、胚性幹細胞より血管内皮細胞を誘導する方法。

(31) 胚性幹細胞が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる細胞である、(1)～(30)のいずれか1項に記載の方法。

(a) 初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(b) 体細胞の核を移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(c) (a)又は(b)の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

[0021] (32) (1)～(4)、(6)～(18)のいずれか1項に記載の方法で用いる、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) を含む胚性幹細胞を培養するための培地。

(33) 該培地がさらに血清を含む(32)に記載の培地。

(34) 該培地がさらに細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である(32)に記載の培地。

(35) 該培地がさらに骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) を含む(34)に記載の培地。

(36) (5)に記載の方法で用いる、骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) および細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地である胚性幹細胞を培養するための培地。

(37) 該培地が白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor) を含まない培地である(32)～(36)のいずれか1項に記載の培地。

[0022] (38) 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である(34)～(37)のいずれか1項に記載の培地。

(a) ゼラチン (gelatin)；

(b) ラミニン (laminin)；

(c) コラーゲンタイプI (collagen type I)；

(d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV)；

(e) フィブロネクチン (fibronectin)。

(39) 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチン (fibronectin) である(38)に記載の培地。

(40) 該培地がさらに以下の(a)、(b)、

(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である(32)、(33)または(37)に記載の培地。

(a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor)；

(b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand)；

(c) インターロイキン3 (interleukin 3)；

(d) トロンボポイエチン (thrombopoietin)。

[0023] (41) 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) および以下の(a)、(b)、(c)、(d)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質を含む培地である(34)、(35)および(37)～(39)のいずれか1項に記載の培地。

(a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor)；

(b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand)；

(c) インターロイキン3 (interleukin 3)；

(d) トロンボポイエチン (thrombopoietin)。

(42) 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) および造血幹細胞因子 (stem cell factor) を含む培地である(41)に記載の培地。

(43) 該培地が、細胞外マトリックス蛋白質、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor)、flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand)、インターロイキン3 (interleukin 3) およびトロンボポイエチン (thrombopoietin) を含む培地である(41)に記載の培地。

(44) 細胞外マトリックス蛋白質が以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)からなる群から選ばれる少なくとも一つの蛋白質である(41)～(43)に記載の培地。

(a) ゼラチン (gelatin)；

(b) ラミニン (laminin)；

(c) コラーゲンタイプI (collagen type I)；

(d) コラーゲンタイプIV (collagen type IV)；

(e) フィブロネクチン (fibronectin)。

(45) 細胞外マトリックス蛋白質がフィブロネクチンである(44)に記載の培地。

[0024] (46) 造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor) を有効成分として含む胚性幹細胞から分化細胞を誘導するための分化誘導剤。

(47) さらに以下の(a)～(y)からなる群から選ばれる少なくとも一つの因子を有効成分として含む(46)に記載の分化誘導剤。

(a) 造血幹細胞因子 (stem cell factor)；

(b) flk-2/flt3リガンド (flk-2/flt3 ligand)；

(c) インターロイキン3 (interleukin 3)；

(d) トロンボポイエチン (thrombopoietin)；

(e) 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)；

(f) エリスロポイエチン (erythropoietin)；

(g) インターロイキン6 (interleukin 6)；

(h) インターロイキン11 (interleukin 11)；

- (i) アクチビンA (activin A) ;
- (j) 骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4) ;
- (k) 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) ;
- (l) インターロイキン1 (interleukin 1) ;
- (m) マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor) ;
- (n) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ;
- (o) インターロイキン7 (interleukin 7) ;
- (p) インターロイキン2 (interleukin 2) ;
- (q) トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) ;
- (r) 神経成長因子 (nerve growth factor) ;
- (s) レチノイン酸 (retinoic acid) ;
- (t) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) ;
- (u) ゼラチン (gelatin) ;
- (v) ラミニン (laminin) ;
- (w) コラーゲンタイプI (collagen type I) ;
- (x) コラーゲンタイプIV (collagen type IV) ;
- (y) フィブロネクチン (fibronectin) .

【0025】(48) (1)～(18)のいずれか1項に記載の方法により得られるエンブリオイドボディ。  
(49) (19)～(31)のいずれか1項に記載の方法を用いることにより誘導される分化細胞。

【0026】(50) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、(1)～(31)のいずれか1項に記載の方法を用い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程における調節に関する物質の評価方法。

(51) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、(1)～(31)のいずれか1項に記載の方法を用い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から分化細胞までの分化過程における調節に関する物質のスクリーニング方法。

(52) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、(49)に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化した細胞の機能を比較することを特徴とする、該分化細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

(53) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、(49)に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から分化した細胞の機能を比較することを特徴とする、該分化細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

【0027】(54) (46)または(47)に記載の分化誘導剤を含む医薬。

(55) (49)に記載の分化細胞を含む医薬。

(56) 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれた細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および/または治療のための医薬である。(54)または(55)に記載の医薬。

(a) 外胚葉由来の細胞；

(b) 中胚葉由来の細胞；

(c) 内胚葉由来の細胞。

(57) 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経組織、松果体、副腎髄質、色素細胞および表皮組織からなる群から選ばれた部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である。(56)に記載の医薬。

(58) 中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、筋組織、結合組織、骨組織、軟骨組織、循環器、血液組織、真皮、泌尿器および生殖系からなる群から選ばれた部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である。(56)に記載の医薬。

(59) 内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、消化管、呼吸器、胸腺、甲状腺、副甲状腺、膀胱、中耳、肝臓および脾臓からなる群から選ばれた部位を構成する細胞の障害に基づく疾患である。(56)に記載の医薬。

【0028】(60) 神経組織を構成する細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、ダウン症候群、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経外傷または神経毒物の障害に起因する疾患であり、松果体を構成する細胞の障害に基づく疾患が松果体症または松果体機能不全であり、副腎髄質を構成する細胞の障害に基づく疾患が副腎機能欠如症または副腎炎であり、色素細胞の障害に基づく疾患が色素異常症または色素過剰症であり、表皮組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床ずれ、皮膚炎、表皮症または乾皮症である。(57)に記載の医薬。

【0029】(61) 筋組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が筋内不全症、筋緊張症または重症筋無力症であり、結合組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が結合組織病、結合組織炎または糖尿病であり、骨組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が骨粗鬆症、骨関節炎、骨形成異常症、骨硬化症、骨髄炎または骨形成不全症であり、軟骨組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が変形関節炎、慢性関節リウマチ、軟骨形成不全症、軟骨発育不全症または軟骨形成異常症であり、循環器を構成する細胞の障害に基づく疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、SLE、狭心症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、再狭窄、血栓、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡循環障害であり、血液組織を構成する細胞の障害に基づく疾患がHIV感染、敗血症、移植片一対一宿主疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、

気道過敏または自己免疫疾患であり、真皮を構成する細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、皮膚炎または乾せんであり、泌尿器を構成する細胞の障害に基づく疾患が溶血性尿毒症候群または腎炎であり、生殖器を構成する細胞の障害に基づく疾患が性器発育不全症または性器発育異常である。(58)に記載の医薬。

【0030】(62) 消化管を構成する細胞の障害に基づく疾患が胃潰瘍、胃炎または十二指腸潰瘍であり、呼吸器を構成する細胞の障害に基づく疾患が肺気腫、肺水腫、肺炎、気管支炎または気管支喘息であり、胸腺を構成する細胞の障害に基づく疾患が胸腺炎、胸腺リンパ形成不全症または胸腺機能減退症であり、甲状腺を構成する細胞の障害に基づく疾患が甲状腺無形成症または甲状腺機能不全症であり、副甲状腺を構成する細胞の障害に基づく疾患が副甲状腺機能低下症であり、膀胱を構成する細胞の障害に基づく疾患が膀胱炎または膀胱破裂であり、中耳を構成する細胞の障害に基づく疾患が中耳炎であり、肝臓を構成する細胞の障害に基づく疾患が肝臓炎症病、慢性B型肝炎またはC型肝炎であり、脾臓を構成する細胞の障害に基づく疾患が糖尿病である。(59)に記載の医薬。

【0031】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

【0032】本発明において、胚性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成するすべての細胞に分化しうる多分化能を有する細胞を包含する。その例としては、(a)：初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞が挙げられ、具体的には、初期胚を構成する内部細胞塊より樹立された細胞であるES細胞、始原生殖細胞から樹立された細胞であるEG細胞(embryonic germ cell)、着床以前の初期胚の多分化能を有する細胞集団(例えば、原始外胚葉)を培養することによって得られる細胞、悪性奇形腫より樹立された細胞である胚性癌細胞(embryonal carcinoma cell; 以下EC細胞とも略す)等が挙げられる。本発明における胚性幹細胞としては、上記(a)の胚性幹細胞、(b)体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞、または(c)(a)あるいは(b)の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞を包含する。

【0033】ES細胞と同様の機能を有するEG細胞およびEC細胞について、ES細胞との関係を以下に説明する。

【0034】EG細胞は、始原生殖細胞を培養する際に塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor)を加えることにより出現したES細胞に類似した細胞から樹立された細胞株である(Y. Matsuiら; Cell, 70, 841, 1992; J. L. Resnicら; Nature, 359, 55

9, 1992)。このEG細胞は、生殖系キメラの形成に寄与できる能力を有しており(C. L. Stewartら; Dev. Biol., 161, 626, 1994; P. A. Laboskyら; Development, 120, 3197, 1994)、ES細胞が有する未分化幹細胞としての性質を有していることが明らかにされている。未分化幹細胞と生殖細胞にはかなり共通した性質があり、増殖や分化の制御状態変化によって比較的容易に相互変換できると考えられている。

【0035】EC細胞は、悪性奇形腫(teratocarcinoma)よりES細胞と同様の多分化能を有する細胞株として樹立された細胞である(M. J. Evans; J. Embryol. Exp. Morph., 28, 163, 1972)。EC細胞は、ES細胞のマーカーとなる遺伝子を発現していること(E. G. Bernsteinら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3899, 1973; S. B. Dwan and L. C. Steven; J. Natl. Cancer Inst., 57, 937, 1976; D. Solter and B. B. Knowles; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5565, 1978; B. A. Hoslerら; Mol. Cell. Biol., 9, 5623, 1989; S. C. Pruitt; Development, 120, 37, 1994)、インビトロにおいて様々な細胞に分化する能力を有していること(G. R. Martin and M. J. Evans; Cell, 6, 467, 1975; G. R. Martin and M. J. Evans; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1441, 1975; M. W. McBurney; J. Cell. Physiol., 89, 441, 1976)、同系個体への移植において様々な組織からなる奇形腫が形成されること(L. J. Kleinsmith and G. B. Pierce; Cancer Res., 24, 797, 1964)、胚盤胞の中に注入すると胎児形成に寄与しキメラ個体を形成すること(B. Mintz and K. Illmensee; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3538, 1975; V. E. Papayannouら; Nature, 258, 70, 1975; M. J. Deweyら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5564, 1977)、極めて稀ではあるがEC細胞株の中には生殖系キメラを作製する能力を持つものがあること(T. A. Stewart and B. Mintz; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981)から、ES細胞が有する未分化幹細胞としての性質を基本的には有した細胞と考えられている。

【0036】本発明において、EBとは、胚性幹細胞をインビトロで培養した場合に観察される、胚性幹細胞が集合して凝集した細胞塊を意味する。この細胞塊は、通常、略球形の形態で浮遊状態で出現し、細胞塊を構成する個々の胚性幹細胞同士が相互に影響しあうことで、細胞塊内部で外胚葉、中胚葉、内胚葉系細胞への分化誘導が引き起こされている。本発明におけるEBとしては、このような胚性幹細胞の分化誘導が引き起こされている凝集状態の胚性幹細胞の細胞塊を包含する。

【0037】本発明は、血清培地、無血清培地のいずれを用いても、また、胚性幹細胞の密度が比較的低くとも、高効率で安定的に胚性幹細胞からEBを形成する方法を提供し、さらにはそれを用いた分化細胞を誘導する方法を提供する。

【0038】胚性幹細胞については、下記の様々な方法で得ることができ、例えばフィーダー細胞上で培養することで未分化状態で維持／増殖させることができる。その後、維持／増殖されている胚性幹細胞を本発明のEB形成方法に付すが、トリプシン等の酵素処理などにより胚性幹細胞をフィーダー細胞から分離して細胞が凝集していない状態で本発明のEB形成方法に付すことが好ましい。

【0039】本発明のEB形成方法において、造血幹細胞増殖因子 (stem cell growth factor; 以下SCGFとも略す。) を含む培地を用いて培養することにより、胚性幹細胞の密度が比較的低くとも高効率で安定的に胚性幹細胞からEBを形成することができる。本発明に用いる培地は、血清培地でも無血清培地でもよい。本発明のEB形成方法において、特に血清培地を使用する場合には、SCGFを含む培地を使用することにより、血清のロットに左右されず高効率で安定的にEBを形成することが可能となる。さらに、SCGFに造血幹細胞因子 (stem cell factor; 以下SCFとも略す)、f1k-2/f113リガンド (f1k-2/f113 ligand; 以下FLとも略す)、インターロイキン3 (interleukin 3; 以下IL-3とも略す)、トロンボポイエチン (thrombopoietin; 以下TPOとも略す) から選ばれる単独あるいは複数の蛋白質を適宜組み合わせる用いることができる。さらに下記の細胞外マトリックス蛋白質を適宜組み合わせる用いてもよい。

【0040】本発明のEB形成方法において無血清培地を使用する場合、基礎培地にSCGFの他に細胞外マトリックス蛋白質を加えて培養することが好ましい。細胞外マトリックス蛋白質を含む培地を使用することにより、無血清培養でありながら比較的低い胚性幹細胞密度の培養でも安定的にEBを形成することができる。さらに骨形成因子4 (bone morphogenetic protein 4; 以下BMP-4とも略す) を加えてもよい。細胞外マトリックス蛋白質とは、生体内で細胞と細胞の間を埋める高分子構造の構成成分となっている蛋白質であるが、本発明においては、該蛋白質および該蛋白質が変性した蛋白質も包含する。細胞外マトリックス蛋白質の例としては、ゼラチン (gelatin)、ラミニン (laminin)、コラーゲンタイプI (collagen type I)、コラーゲンタイプIV (collagen type IV) あるいはフィブロネクチン (fibronectin) があげられるが、特にフィブロネクチンが好ましい。

【0041】無血清培地を使用する場合、さらにSCF、FL、IL-3、TPOから選ばれる少なくとも1つの蛋白質を添加して用いるのが好ましい。特に (i) SCF、(ii) FLとIL-3とTPOを添加するのが好ましい。また、SCGFを含まない細胞外マトリックス蛋白質およびBMP-4を含む無血清培地でも安定的にEBを形成することができる。なお、細胞外マトリッ

クス蛋白質のみを添加した基礎培地による無血清培養でもEBは形成されるが、このEBからは、後述する分化細胞の誘導を効率的に行うことができない。

【0042】本発明において、SCGFとは、国際公開WO98/08869に造血幹細胞増殖因子として記載されている因子を意味する。SCGFの遺伝子の染色体上の位置は決定されており1遺伝子であることが明らかにされているが、2種類のスプライシング形態 $\alpha$ と $\beta$ が存在することが知られている (H. Mioら; Biochem. Biophys. Res. Commun., 249, 124, 1998)。本発明においてSCGFとは、全長型であるスプライシング形態 $\alpha$ が有する活性を有するすべてのスプライシング形態を包含する。また、この蛋白質において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ増殖因子としての活性を有する蛋白質、並びにこの蛋白質とアミノ酸配列の同一性が、BLAST (S.F. Altschulら; J. Mol. Biol., 215, 403, 1990) やFASTA (W.R. Pearsonら; Methods Enzymol., 183, 63, 1990) 等の解析プログラムを用いて計算したときに、60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ増殖因子としての活性を有する蛋白質も本発明においてSCGFとして用いることができる。

【0043】本発明において、SCFとしては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP21583 (ヒトSCF)、CAA67698 (マウスSCF)、A4002827 (ラットSCF)、BA09445 (ネコSCF)、Q06220 (イヌSCF)、AAB49491 (ヒツジSCF)、Q29030 (ブタSCF)、547571 (ウシSCF)、JN0637 (ニワトリSCF) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。FLとしては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP49771 (ヒトFL)、A49265 (マウスFL)、AAF87089 (ネコFL)、AAF87088 (イヌFL)、AAF99322 (ウシFL) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。IL-3としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP08700 (ヒトIL-3)、P01586 (マウスIL-3)、P04823 (ラットIL-3)、JC4266 (ウシIL-3)、I46407 (ヒツジIL-3) A50159 (サルIL-3) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。TPOとしては、公的データベースNCBIにAAA74083 (ヒトTPO)、P40226 (マウスTPO)、P49745 (ラットTPO)、P42706 (ブタTPO)、P42705 (イヌTPO) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。これらの因子は増殖因子としての活性を有するが、これら蛋白質において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ増殖因子としての活性を有する蛋白質、並びにこれらの蛋白質と、BLASTやFASTA等の解析プログラムを用いて計算したときに、60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ増殖因子

としての活性を有する蛋白質も本発明においてSCF、FL、IL-3あるいはTPOとして用いることができる。

【0044】1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質は、これらの蛋白質をコードするDNAを以下に示す方法で取得し、J. Sambrookら; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989等に記載された遺伝子組換え法、即ち該DNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入して得られた形質転換体を培養し、該培養物より取得することができる。該DNAは、cDNAクローニング(J. Sambrookら; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)やRT-PCR法(M. Innisら; PCR Protocols, Academic Press, 1990)等の方法により得られた上記のアミノ酸配列をコードするDNAに対し、T.A. Kunkel; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488, 1985, W. Itoら; Gene, 102, 57, 1991, M. J. Zoller and M. Smith; Nucleic Acids Res., 10, 6487, 1982, T. Hashimoto-Gotohら; Gene, 152, 271, 1995等に記載の方法を用いて、部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。また、目的変異(欠失、置換、付加または挿入)を導入した配列をそれぞれの5'端に持つ1組のプライマーを用いたPCR[Hb. SN et al., Gene 77, 51(1989)]によっても、取得することができる。

【0045】本発明において、セラチンとは、水溶性の変性したコラーゲンを意味し、例えば、シグマ社の製品番号G9391, G1393, G1890, G7135などのセラチンが挙げられるが、これに限定されず様々なセラチンが使用できる。

【0046】本発明において、ラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖の3重体からなる蛋白性因子であり、 $\alpha$ 鎖としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにアクセス番号P25391(ヒトラミニン $\alpha$ 1)、P19137(マウスラミニン $\alpha$ 1)、P24043(ヒトラミニン $\alpha$ 2)、Q50575(マウスラミニン $\alpha$ 2)、Q16787(ヒトラミニン $\alpha$ 3)、Q61789(マウスラミニン $\alpha$ 3)、AAB17053(ラットラミニン $\alpha$ 3)、Q16363(ヒトラミニン $\alpha$ 4)、CAA70970(マウスラミニン $\alpha$ 4)、CAC22310(ヒトラミニン $\alpha$ 5)、Q51001(マウスラミニン $\alpha$ 5)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等、 $\beta$ 鎖としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにアクセス番号P07942(ヒトラミニン $\beta$ 1)、AAA39407(マウスラミニン $\beta$ 1)、P55268(ヒトラミニン $\beta$ 2)、Q61292(マウスラミニン $\beta$ 2)、P15800(ラットラミニン $\beta$ 2)、BAA22253(ヒトラミニン $\beta$ 3)、Q51087(マウスラミニン $\beta$ 3)、としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等、 $\gamma$ 鎖としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにアクセス番号AAA59488(ヒトラミニン $\gamma$ 1)、P02468(マウスラ

ミニン $\gamma$ 1)、Q13753(ヒトラミニン $\gamma$ 2)、Q61092(マウスラミニン $\gamma$ 2)、AAD36991(ヒトラミニン $\gamma$ 3)、AAF08983(マウスラミニン $\gamma$ 3)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等をそれぞれ挙げることができる。組織から精製したもの(例えば、シグマ・アルドリッチ社のカタログ番号L6274, L2020のラミニン)も用いることができる。

【0047】コラーゲンタイプIは、 $\alpha$ 鎖の3重体からなる蛋白性因子であり、 $\alpha$ 鎖としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにCAA98968(ヒトコラーゲンタイプI $\alpha$ 1)、P11087(マウスコラーゲンタイプI $\alpha$ 1)、P08123(ヒトコラーゲンタイプI $\alpha$ 2)、Q01149(マウスコラーゲンタイプI $\alpha$ 2)、AAD41775(ラットコラーゲンタイプI $\alpha$ 2)、P02465(ウシコラーゲンタイプI $\alpha$ 2)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等が挙げられる。組織から精製したもの(例えば、シグマ・アルドリッチ社のカタログ番号C9791, C8919, C7661, C1809のコラーゲンタイプI)も用いることができる。

【0048】コラーゲンタイプIVは、 $\alpha$ 鎖の3重体からなる蛋白性因子であり、 $\alpha$ 鎖としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP02462(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 1)、P02463(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 1)、P08572(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 2)、P08122(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 2)、CAA56335(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 3)、AAD50449(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 3)、P53420(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 4)、AAD50450(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 4)、S22917(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 5)、I48304(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 5)、CGH05B(ヒトコラーゲンタイプIV $\alpha$ 6)、BAB13674(マウスコラーゲンタイプIV $\alpha$ 6)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等が挙げられる。組織から精製したもの(例えば、シグマ・アルドリッチ社のカタログ番号C5533, C0543のコラーゲンタイプIV)も用いることができる。

【0049】フィブロネクチンとしては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP02751(ヒトフィブロネクチン)、P11276(マウスフィブロネクチン)、P04937(ラットフィブロネクチン)、P07589(ウシフィブロネクチン)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質等が挙げられる。組織から精製したもの(例えば、シグマ・アルドリッチ社のカタログ番号F4759, F2006, F1141, F0895, F0535のフィブロネクチン)も用いることができる。

【0050】これらの因子は細胞外マトリックス蛋白質としての機能を有するが、上記アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ細胞外マトリックス蛋白質としての機能を有する蛋白質、並びにこれらの蛋白



質と、BLASTやFASTA等の解析プログラムを用いて計算したときに、60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ細胞外マトリックス蛋白質としての機能を有する蛋白質も本発明においてラミニン、コラーゲンタイプI、コラーゲンタイプIVあるいはフィブロネクチンとして用いることができる。1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記SCF、FL、IL-3あるいはTPOについて記載した方法と同様の方法により取得することができる。

【0051】本発明のEB形成方法においては、LIFを含まない培地を用いることが好ましい。培地にLIFを含まないとは、成分としてLIFを培地に入為的に添加しないことを意味する。LIFとしては、A. G. Smith and M. L. Hooper; Dev. Biol., 121, 1, 1987. A. G. Smithら; Nature, 336, 688, 1988. P. D. Rathienら; Genes Dev., 4, 2308, 1990. NCBI (National Center for Biotechnology Information) の公的な蛋白質データベースにアクセス番号P15018 (ヒトLIF)、P09056 (マウスLIF)、P17777 (ラットLIF) 等で公知化されている蛋白質因子等が挙げられる。

【0052】本発明のEB形成方法により得られたEBは、分化誘導される分化細胞の分離源として用いることができる。また、EBあるいはその一部分も胚葉や、細胞分化などの胚性幹細胞の動態に影響を及ぼす物質のスクリーニング方法や評価方法に用いることができる。本発明のEB形成方法によりEBを形成した後、さらに培養を続けることで分化誘導された細胞を形成することができる。分化誘導に際しては、後述の分化因子を加えることや、また接着培養を行うことが好ましいが、これらが必須ではない。分化因子の添加や接着培養を行う場合は、EB形成前、EB形成後のどちらでも行うことができるが、EB形成後に行うことが好ましい。

【0053】本発明において、外胚葉とは、発生過程で神経管、神経冠、表皮をつくる能力を有した細胞から構成される胚葉を包含する。その例としては、原始外胚葉から分化した胎児の外胚葉が挙げられる。

【0054】本発明において、外胚葉由来の細胞とは、外胚葉から分化した細胞で、かつ生体を構成する機能細胞を包含する。その例としては、神経組織、松果体、副腎髄質、色素体あるいは表皮組織を構成する細胞が挙げられる。神経組織としては、神経管あるいは神経冠より分化誘導される脳、眼杯、脳下垂体後葉、運動性脳神経、脊髄、運動性脊髄神経、感覚性脳神経、感覚性脊髄神経、交感神経などが挙げられる。松果体を構成する細胞としては、神経管より分化誘導される松果腺を構成する細胞などが挙げられる。色素体を構成する細胞としては、神経冠より分化誘導される色素細胞などが挙げられる。表皮組織としては、発生過程の表皮より分化誘導される毛、爪、歯、腺、水晶体などが挙げられる。副腎

髄質は神経冠より分化誘導される。

【0055】本発明において、中胚葉とは、発生過程で側板、腎部、体節、頭部中胚葉をつくる能力を有した細胞から構成される胚葉を包含する。その例としては、原始外胚葉から分化した胎児の中胚葉が挙げられる。

【0056】本発明において、中胚葉由来の細胞とは、中胚葉から分化した細胞で、かつ生体を構成する機能細胞を包含する。その例としては、筋組織、結合組織、骨組織、軟骨組織、循環器、血液組織、真皮、泌尿器あるいは生殖器を構成する細胞が挙げられる。筋組織としては、側板より分化誘導される平滑筋、体節より分化誘導される胴部の筋肉、横紋筋、頭部中胚葉より分化誘導される頭部の筋肉などが挙げられる。結合組織としては、側板より分化誘導される結合組織や臓膜などが挙げられる。骨組織および軟骨組織としては、体節より分化誘導される脊椎、四肢の骨格、頭部中胚葉より分化誘導される頭骨、歯の骨質などが挙げられる。循環器としては、側板より分化誘導される心臓、血管内臓、腎部より分化誘導される前腎、中腎、後腎などが挙げられる。血液組織としては、側板より分化誘導される血球などが挙げられる。泌尿器としては、腎部より分化誘導される前腎、中腎、後腎などが挙げられる。生殖器としては、腎部より分化誘導される輸精管、輸卵管などが挙げられる。真皮は体節より分化誘導される。

【0057】本発明において、内胚葉とは、発生過程で前腸、中腸、後腸、尿膜をつくる能力を有した細胞から構成される胚葉を包含する。その例としては、原始外胚葉から分化した胎児の内胚葉が挙げられる。

【0058】本発明において、内胚葉由来の細胞とは、内胚葉から分化した細胞で、かつ生体を構成する機能細胞を包含する。その例としては、消化管、呼吸器、胸腺、甲状腺、副甲状腺、膀胱、中耳、肝臓あるいは脾臓を構成する細胞が挙げられる。消化管としては、前腸より分化誘導される食道、胃、脾臓、十二指腸、中腸より分化誘導される小腸、後腸より分化誘導される大腸、肛門などが挙げられる。呼吸器としては、前腸より分化誘導される肺、気管などが挙げられる。胸腺、甲状腺、副甲状腺、中耳、肝臓、脾臓は前腸より、膀胱は尿膜より分化誘導される。

【0059】本発明の具体的な培養方法、培養条件について以下に詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0060】1. 胚性幹細胞の調製

##### (1) 胚性幹細胞の調製

本発明のEB形成方法に付す胚性幹細胞は、Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994). J. A. Thomsonら; Science, 282, 1145, (1998), M. J. Shamblottら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13726, (1998). J. A. Thomsonら; Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 92, 7844, (1996). 米国特許 5,453,357号. 米国特許 5,570,372号等に記載された方法に従って調製することができる。例えば、マウス (M.J. Evansら; *Nature*, 292, 154, 1981; G. R. Martin; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634, 1981)、ラット (P.M. Iannacconeら; *Dev. Biol.*, 163, 288, 1994)、ニワトリ (B. P. Painら; *Development*, 122, 2339, 1996; 米国特許第5,340,740号; 米国特許第5,555,479号)、ブタ (M.B. Wheeler; *Procid. Fertil. Dev.*, 5, 563, 1994; H. Shimura; *Biol. Reprod.*, 57, 1089, 1997)、サル (J.A. Thomsonら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7844, 1996)、ヒト (J.A. Thomsonら; *Science*, 282, 1145, 1998; M.J. Shamblottら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13726, 1998)についての胚性幹細胞の樹立方法が知られており、各々に記載の方法に従って、本発明に用いられる胚性幹細胞を調製することができる。

【0061】得られた胚性幹細胞の培養方法としては、*Maintaining the Mouse Embryo Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), *Methods in Enzymology* volume 225, *Guide to Techniques in Mouse Development*, Academic Press (1993), *バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲットング*, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 幸土社 (1995) 等に記載の胚性幹細胞を培養するための方法が挙げられる。無血清培養することも可能で、例えば、Dulbecco MEM培地に15~20%のKNOCKOUT™ SR (Life Technologies社製)、2mMグルタミン、100μM MEM Non-Essential Amino Acids溶液、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、100μM 2-メルカプトエタノール、および1,000U/ml LIFを加えた培地を用い、未分化な胚性幹細胞としての性質を保ったまま増殖培養することができる (M. D. Goldsboroughら; *Focus*, 20, 8, 1998)。

【0062】本発明においては、単一細胞状態とした胚性幹細胞を用いて本発明のEB形成方法を行いEB形成を行うことが好ましいが、単一細胞状態とした胚性幹細胞を得る方法としては、組織細胞培養で用いられる既に公知の酵素消化の方法が挙げられる。その具体的例としては、ほぼコンフルエント状態にまで増殖した胚性幹細胞を培養している培養皿から培地を除き、PBSを用いて数回、好ましくは2~3回洗浄し、適当な酵素消化液 (例えば、1mM EDTAおよび0.25%トリプシンを含むPBS) を加え、37℃で数十分間、好ましくは5~20分間培養し、下記2の培地にけん濁し、遠心操作 (例えば、4℃、200xgで5分間) を行ない、再び下記2の培地にけん濁することで単一細胞状態とした胚性幹細胞を回収することができる。

【0063】単一細胞状態とした胚性幹細胞の培養に使用できる培養器としては、胚性幹細胞を培養できるものであればいかなる培養器でも用いることができるが、好

ましくは細胞培養用に用いられる培養器が望ましい。細胞培養用の培養器としては、例えば、フラスコ、細菌培養用フラスコ、細胞培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、コンツアーデッシュ、パーアノックスデッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロエルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、セバレストリップウェル、テラサキプレート、組織培養用チャンバースライド、シャーレ、細胞培養用シャーレ、組織培養用チューブ、トレイ、細胞培養用トレイ、セルファクトリー、培養バッグ、テクノボット、ローラーボット、スピナー、フローファイバー等が挙げられる。培養器と細胞との接着性を制御するために、培養器の細胞と接触する側の表面を人工的に処理を施すこともできる。培養器の表面を人工的に処理する例としては、コラーゲンコート、ゼラチンコート、ポリ-L-リジンコート、フィブロネクチンコート、ラミニンコート、プロテオグリカンコート、グリコプロテインコート、マトリゲルコート、シリコンコート等が挙げられる。また、プライマリア (Primaria; Becton Dickinson社製) などのように負の電荷を持つように処理することもできる。これらの処理を施した培養器の中で特に、コラーゲンタイプIコート、コラーゲンタイプIVコート、ゼラチンコート、フィブロネクチンコート、ラミニンコートした培養器が好ましく用いられる。

【0064】(2) 体細胞の核を核移植した胚性幹細胞の作製

本発明においては、体細胞の核を核移植した胚性幹細胞を用いることができる。

【0065】哺乳動物細胞の体細胞の核を移植し正常な発生を開始した卵は、Wilmutら (*Nature*, 385, 810, 1997)、Cibelliら (*Science*, 280, 1256, 1998)、入谷明ら (蛋白質酵素, 44, 892, 1999)、Baquisら (*Nature Biotechnology*, 17, 456, 1999)、Wakayamaら (*Nature*, 394, 369, 1998; *Nature Genetics*, 22, 127, 1999; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14984, 1999)、Rideout IIIら (*Nature Genetics*, 24, 109, 2000) 等によって報告された方法を用い、例えば以下のように作製することができる。

【0066】哺乳動物細胞の核を摘出後初期化 (核を再び発生を繰り返すことができるような状態に戻す操作) し、除核した哺乳動物の未受精卵に注入する方法を用いて発生を開始させ、発生を開始した卵を培養することによって、他の体細胞の核を有し、かつ正常な発生を開始した卵が得られる。

【0067】体細胞の核を初期化する方法としては、複数の方法が知られているが、例えば以下のように行うことができる。核を提供する側の細胞を培養している培地を、5~30%、好ましくは10%の仔ウシ胎児血清を含む培地 (例えば、M2培地) から0~1%、好ま

しくは0.5%の仔ウシ胎児血清を含む栄養培養地に交えて3〜10日間、好ましくは5日間、培養することで細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。また、同種の哺乳動物の除核した未受精卵に、核を提供する側の細胞の核を注入し数時間、好ましくは約1〜6時間培養することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

【0068】初期化された核は除核された未受精卵中で発生を開始することが可能となる。初期化された核を除核された未受精卵中で発生を開始させる方法としては複数の方法が知られている。例えば、細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導し初期化した核を、電気融合法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植することで卵子を活性化し発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。また、同種の哺乳動物の除核した未受精卵に核を注入することで初期化した核を、再度マイクロマニピュレーターを用いた方法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植し、卵子活性化物質（例えば、ストロンチウムなど）で刺激後、細胞分裂の阻害物質（例えば、サイトカリンBなど）で処理し第二極体の放出を抑制することで発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

【0069】いったん発生を開始した卵が得られれば、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993), バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載の公知の方法を用い、胚性幹細胞を取得することができる。

【0070】(3) 染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞の作製

染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞（例えば、組織適合性抗原を改変した胚性幹細胞）は、相同組換え技術を用いることによって作製することができる。

【0071】染色体上の標的遺伝子の改変（例えば、組織適合性抗原の改変）は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993), バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載の方法を用い、例えば以下のように行なうことができる。

【0072】改変する標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子）のゲノム遺伝子を単離する。

【0073】単離したゲノム遺伝子を用いて標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製したターゲットベクターを胚性幹細胞に導入し、標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子）とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を作製することができる。

【0074】標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons）等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム（Genome Systems社製）やUniversal GenomeWalker™ Kits（CLONTECH社製）などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することができる。

【0075】標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993), バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

【0076】相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993), バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第2版）やPCR法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] 等が挙げられる。

【0077】2. 本発明の培地

上記のようにして得られて維持/増殖されている胚性幹細胞を、本発明のEB形成方法に付してEBを形成させるが、その際に用いる培地とは、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。

【0078】基礎培地としては、DMEM培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 362, 1965), BGJb培地 (Exp. Cell Res., 25, 41, 1961), CMRL 1065培地 (N. Y. Aca

denyof Sciences, 5, 303, 1957), Glasgow MEM培地 (Virology, 16, 147, 1962), Improved MEM Zinc Opt ion培地 (J. National Cancer Inst., 49, 1705, 1972), IMDM培地 (In Vitro, 9, 6, 1970), Medium 199培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1, 1950), Eagle MEM培地 (Science, 130, 432, 1959), AlphaMEM培地 (Nature New Biology, 230, 310, 1971), Dulbecco MEM培地 (Virology, 8, 396, 1959), ハム培地 (Exp. Cell Res., 29, 515, 1963; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288, 1965), RPMI 1540培地 (J. A. M. A., 199, 519, 1957), Fischer's培地 (Methods in Med. Res., 10, 1964), McCoy's培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100, 115, 1959), ウィリアムスE培地 (Exp. Cell Res., 69, 106, 1971; Exp. Cell Res., 89, 139, 1974) およびこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であればいずれも用いることができる。

【0079】また、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), Methods in Enzymology volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993), バイオマニュアルシリーズ8 シーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載の胚培養のための培地、例えば、M2培地、M16培地、Whitten培地、体外受精用培地など、胚の培養に用いることのできる培地であればいずれも基礎培地として用いることができる。

【0080】さらに、これら培地に、血清を添補した培地、血清代替物としての各種増殖因子を添加した培地、ストローマ細胞などが産生する因子を添加した培地、あるいは無血清培地であっても動物細胞や胚の培養が可能であるものであればいずれも用いることができる。その具体的例として、市販のKNOCKOUT<sup>TM</sup> SRを添加した無血清培地 (M. D. Goldsborough; Focus, 20, 8, 1998)、インスリンおよびトランスフェリンを添加した無血清培地 [例えば、CHO-S-SFM II (Life Technologies社製)、Hybridoma-SFM (Life Technologies社製)、e RDF Dry Powdered Media (Life Technologies社製)、UltraCULTURE<sup>TM</sup> (Biowhittaker社製)、UltraCMA<sup>TM</sup> (Biowhittaker社製)、UltraC<sup>TM</sup> (Biowhittaker社製)、UltraMDCK<sup>TM</sup> (Biowhittaker社製)、ITPSQ培地 (S. Hosoi; Cytotechnology, 5, S17, 1991)、IT SFn培地 (A. Rizzino and C. Growley; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457, 1980)、mN3培地 (S. Okabe; Mech. Dev., 59, 89, 1996) など]、細胞由来の因子を添加した培地 [例えば、多能性奇形腫細胞PS A1の培養上清を添加した培地 (G. R. Martin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981)]、または無血清培地 [例えば、CD-CHO (Life Technologies社製)、

PFHM-II (Life Technologies社製)、UltraCMA-PF<sup>TM</sup> (Biowhittaker社製) など] が挙げられる。

【0081】これら基礎培地の好適な例として、実施例1に記載した無血清基本培地 (50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、2 mM グルタミン、1% 牛血清アルブミン、10  $\mu$ g/mL 牛脾インスリン、200  $\mu$ g/mL ヒトトランスフェリンおよび40  $\mu$ g/mL 低比重リポ蛋白質 (low density lipoprotein; LDL) を含むIMDM培地) が挙げられる。この無血清基本培地において、IMDM培地に加えられる各添加物の濃度は上述の濃度の100倍～100分の1、好ましくは10倍～10分の1に変更しても構わない。

【0082】本発明において、血清培地とは、上記の基礎培地にさらに哺乳動物あるいはニワトリ等の血清を含む培地を意味する。哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、サル等が挙げられる。

【0083】これら基礎培地あるいは血清培地に、SCGFを培地中の濃度が1  $\mu$ g/mL～10  $\mu$ g/mL、好ましくは1 ng/mL～1  $\mu$ g/mL、より好ましくは10 ng/mL～100 ng/mLになるように添加することで、本発明の、胚性幹細胞を培養するための培地を調製することができる。無血清培地の場合はさらに100 ng/mL～1 mg/mLの細胞外マトリックス蛋白質を添加するのが好ましい。細胞外マトリックス蛋白質としては、ゼラチン、ラミニン、コラーゲンタイプI、コラーゲンタイプIVまたはフィブロネクチンが挙げられる。また、細胞外マトリックス蛋白質は基礎培地に直接添加せず、培養器の細胞が接触する表面にコートすることで、培養する胚性幹細胞に作用させても構わない。このような細胞外マトリックス蛋白質の用い方も、広義に、基礎培地にSCGFおよび細胞外マトリックス蛋白質を添加した培地に含まれる。この培地にさらに1  $\mu$ g/mL～10  $\mu$ g/mL、好ましくは1 ng/mL～1  $\mu$ g/mL、より好ましくは10 ng/mL～100 ng/mLのBMP-4を添加してもよい。

【0084】更に好ましくは、上記の培地にSCGFとともに、以下の(vi)～(x)に示した蛋白質を培地中の濃度が1  $\mu$ g/mL～10  $\mu$ g/mL、好ましくは1 ng/mL～1  $\mu$ g/mL、より好ましくは10 ng/mL～100 ng/mLになるように単独あるいは複数添加することで、本発明の、胚性幹細胞を培養するための培地を調製することができる。

- (vi) SCF;
- (vii) FL;
- (ix) IL-3;
- (x) TPO。

【0085】本発明のEB形成方法において、特に血清培地を使用する場合には、培地にSCGFを加えて培養

することにより、血槽のロットに左右されず高効率で安定的にEBを形成することができる。さらに、細胞外マトリックス蛋白質を適宜組み合わせてもよい。

【0086】本発明のEB形成方法において無血清培地を使用する場合、基礎培地にSCGFとともに上記細胞外マトリックス蛋白質を加えて培養することにより、無血清培養でありながら比較的低密度の培養でも安定的にEBを形成することができる。細胞外マトリックス蛋白質としては、特にフィブロネクチンが好ましい。無血清培養の場合、特に(1)SCF、(11)FLとIL-3

とTPOの添加が好ましい。  
【0087】また、基礎培地に1pg/mL~10μg/mL、好ましくは1ng/mL~1μg/mL、より好ましくは10ng/mL~100ng/mLのBMP-4および100ng/mL~1mg/mLの細胞外マトリックス蛋白質を添加することによっても本発明の、胚性幹細胞を培養するための培地を調製することができる。細胞外マトリックス蛋白質としては、ゼラチン、ラミニン、コラーゲンタイプI、コラーゲンタイプIVまたはフィブロネクチンが挙げられるが、特にフィブロネクチンが好ましい。細胞外マトリックス蛋白質は基礎培地に直接添加せず、培養器の細胞が接触する表面にコートすることで、培養する胚性幹細胞に作用させても構わない。このような細胞外マトリックス蛋白質の用い方も、広義に、基礎培地にBMP-4および細胞外マトリックス蛋白質を添加した培地に含まれる。

【0088】また、胚性幹細胞より目的とする分化細胞をより効率的に誘導するために、上述の培地に、さらに、以下の(x1)~(xxviii)に示した因子を培地中の濃度が1pg/mL~10μg/mL、好ましくは1ng/mL~1μg/mL、より好ましくは10ng/mL~100ng/mLになるように単独あるいは複数添加することができる。以下の因子を含んだ培地も、本発明の、胚性幹細胞を培養するための培地として用いることができる。

【0089】(x1) インターロイキン3 (interleukin 3) ;  
(xii) トロンボポイエチン (thrombopoietin) ;  
(xiii) 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) ;  
(xiv) エリスロポイエチン (erythropoietin) ;  
(xv) インターロイキン6 (interleukin 6) ;  
(xvi) インターロイキン11 (interleukin 11) ;  
(xvii) アクチビンA (activin A) ;  
(xviii) BMP-4 ;  
(xix) 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) ;  
(xx) インターロイキン1 (interleukin 1) ;  
(xxi) マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor) ;

(xxii) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ;  
(xxiii) インターロイキン7 (interleukin 7) ;  
(xxiv) インターロイキン2 (interleukin 2) ;  
(xxv) トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor-β) ;  
(xxvi) 神経成長因子 (nerve growth factor) ;  
(xxvii) レチノイン酸 (retinoic acid) ;  
(xxviii) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) 。

【0090】本発明において、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; 以下VEGFとも略す) としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにAAC63102 (ヒトVEGF)、Q00731 (マウスVEGF)、AAF19211 (ラットVEGF)、P26617 (モルモットVEGF)、AAG16241 (ハムスターVEGF)、CAB82426 (イヌVEGF)、S57956 (ヒツジVEGF)、S52130 (ブタVEGF)、B40580 (ウシVEGF) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。エリスロポイエチン (erythropoietin; 以下EPOとも略す) としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにCAA26094 (ヒトEPO)、P07321 (マウスEPO)、P29676 (ラットEPO)、P33708 (ネコEPO)、P33707 (イヌEPO)、I46401 (ヒツジEPO)、P49157 (ブタEPO)、P48617 (ウシEPO)、AAG36962 (ウサギEPO)、Q28513 (サルEPO) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。

【0091】インターロイキン6 (interleukin 6; 以下IL-6とも略す) としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP05231 (ヒトIL-6)、P08505 (マウスIL-6)、P20607 (ラットIL-6)、AAF86650 (ウサギIL-6)、I46084 (ネコIL-6)、AF86275 (イヌIL-6)、S29549 (ヒツジIL-6)、I46590 (ブタIL-6)、A56610 (ウシIL-6)、Q28319 (ヤギIL-6)、P51494 (サルIL-6)、T09216 (ウマIL-6) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。インターロイキン11 (interleukin 11; 以下IL-11とも略す) としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP20809 (ヒトIL-11)、P47873 (マウスIL-11)、A38285 (サルIL-11) としてアミノ酸配列が登録されている蛋白質因子等が挙げられる。アクチビンA (activin A) としては、NCBIの公的な蛋白質データベースにP08476 (ヒトインヒビンβA)、Q04998 (マウスインヒビンβA)、P18331 (ラットインヒビンβA)、P43032 (ヒツジインヒビンβA)、P03970 (ブタインヒビンβA)、P07995 (ウシインヒビンβA)、P55102 (ウマインヒビンβA)、P27092 (ニワトリインヒビンβA) としてアミノ酸配列が登録されているインヒビンβA鎖前

駆体のC末より生ずるインヒビンβA鎖ポリペプチドのホモダイマーである蛋白性因子等が挙げられる。

【0092】BMP-4としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP12644(ヒトBMP-4)、P21275(マウスBMP-4)、Q06826(ラットBMP-4)、Q46576(ウサギBMP-4)、Q0752(ニワトリBMP-4)としてアミノ酸配列が登録されている前駆体のC末から生ずる成熟体ポリペプチドの二量体である蛋白性因子等が挙げられる。塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; 以下bFGFとも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP09038(ヒトbFGF)、P15655(マウスbFGF)、AAA41210(ラットbFGF)、P48799(ウサギbFGF)、P20503(ヒツジbFGF)、P03969(ウシbFGF)、A48834(ニワトリbFGF)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白性因子等が挙げられる。インターロイキン1(interleukin1; 以下IL-1とも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP01583(ヒトIL-1α)、CAA26372(ヒトIL-1β)、P01582(マウスIL-1α)、P19749(マウスIL-1β)、P15598(ラットIL-1α)、Q63264(ラットIL-1β)、P04822(ウサギIL-1α)、P14628(ウサギIL-1β)、G46613(ネコIL-1α)、P41687(ネコIL-1β)、Q46612(イヌIL-1α)、Q28579(ヒツジIL-1α)、P21521(ヒツジIL-1β)、P18430(ブタIL-1α)、P26889(ブタIL-1β)、P08831(ウシIL-1α)、P09428(ウシIL-1β)、P79161(ヤギIL-1α)、P79162(ヤギIL-1β)、P48089(サルIL-1α)、P48090(サルIL-1β)、BAA07717(ウマIL-1α)、Q28386(ウマIL-1β)、CAA75239(ニワトリIL-1β)としてアミノ酸配列が登録されている前駆体のC末から生ずる蛋白性因子等が挙げられる。

【0093】マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; 以下M-CSFとも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP09503(ヒトM-CSF)、P07141(マウスM-CSF)、BAA31556(ウシM-CSF)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白性因子等が挙げられる。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; 以下GM-CSFとも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP04141(ヒトGM-CSF)、P01587(マウスGM-CSF)、Q50481(モルモットGM-CSF)、Q62757(ネコGM-CSF)、P48749(イヌGM-CSF)、P28773(ヒツジGM-CSF)、Q29118(ブタGM-CSF)、P11052(ウシGM-CSF)、AAG16526(サルGM-CSF)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白性因子等が挙げられる。インターロイキン7(interleukin7; 以下IL-7とも略す)としては、

NCBIの公的な蛋白データベースにP13232(ヒトIL-7)、P10168(マウスIL-7)、P56478(ラットIL-7)、Q28540(ヒツジIL-7)、BAA95385(ブタIL-7)、P26895(ウシIL-7)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白性因子等が挙げられる。インターロイキン2(interleukin2; 以下IL-2とも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP01585(ヒトIL-2)、S37289(マウスIL-2)、P17108(ラットIL-2)、Q77620(ウサギIL-2)、Q07885(ネコIL-2)、BAA06378(イヌIL-2)、P19114(ヒツジIL-2)、P26891(ブタIL-2)、P05016(ウシIL-2)、P36835(ヤギIL-2)、Q29615(サルIL-2)、P37997(ウマIL-2)、CAA12025(ニワトリIL-2)としてアミノ酸配列が登録されている蛋白性因子等が挙げられる。

【0094】トランスフォーミング増殖因子β(transforming growth factor-β; 以下TGF-βとも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP01137(ヒトTGF-β1)、P08112(ヒトTGF-β2)、P10500(ヒトTGF-β3)、P04202(マウスTGF-β1)、P27090(マウスTGF-β2)、P17125(マウスTGF-β3)、P17246(ラットTGF-β1)、Q07258(ラットTGF-β3)、P54831(イヌTGF-β1)、P50414(ヒツジTGF-β1)、P03720(ブタTGF-β1)、P09858(ブタTGF-β2)、P15203(ブタTGF-β3)、P18341(ウシTGF-β1)、WFM082(サルTGF-β2)、Q19011(ウマTGF-β1)、P09531(ニワトリTGF-β1)、P30371(ニワトリTGF-β2)、P15047(ニワトリTGF-β3)としてアミノ酸配列が登録されている前駆体のC末から生ずる成熟体ポリペプチドの二量体である蛋白性因子等が挙げられる。神経成長因子(nerve growth factor; 以下NGFとも略す)としては、NCBIの公的な蛋白データベースにP01138(ヒトNGF)、P01139(マウスNGF)、P25427(ラットNGF)、P19093(モルモットNGF)、Q29074(ブタNGF)、P13600(ウシNGF)、P05200(ニワトリNGF)としてアミノ酸配列が登録されている前駆体より生ずる成熟体ポリペプチドの二量体である蛋白性因子等が挙げられる。これらの因子はサイトカインとしての活性を有するが、これら蛋白質において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入およびまたは付加されたアミノ酸配列を有し、かつサイトカインとしての活性を有する蛋白質。並びにこれらの蛋白質とBLASTやFASTA等の解析プログラムを用いて計算したときに、60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつサイトカインとしての活性を有する蛋白質も本発明においてVEGF、EPO、IL-6、IL-11、アクチビンA、BMP-4、bFGF、IL-1、M-CSF、GM-CSF、IL-7、IL-2、TGF-βあるいはNGF

として用いることができる。1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記SCF、FL、IL-3あるいはTPOについて記載した方法と同様の方法により取得することができる。

【0095】3. 本発明のEB形成方法による、胚性幹細胞の培養

本発明の、胚性幹細胞からEBを形成するための具体的培養方法としては、用いる胚性幹細胞の培養に適した培養法であればいずれも用いることができ、単層培養法、支持細胞との共培養法、高密度維持培養法、マイクロキャリア培養法、遠流培養法、微重力培養法等を挙げることができる。具体的な方法の例としては、例えば、単一細胞状態（酵素消化等を施すことで細胞同士の接着がない個々の細胞がバラバラになった状態）とした胚性幹細胞を上記2の培地に5細胞/mL〜500,000細胞/mL、好ましくは10細胞/mL〜100,000細胞/mL、より好ましくは100細胞/mL〜10,000細胞/mL、さらに好ましくは500細胞/mL〜5000細胞/mLの細胞密度になるように懸濁し、培養器に播種後、3〜30日間、好ましくは4〜20日間、37℃で数%、好ましくは5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養する方法を挙げることができる。

【0096】無血清培地に、SCGFまたはBMP-4および細胞外マトリックス蛋白質（好ましくは上記(i)〜(vi)の細胞外マトリックス蛋白質、特にフィブロネクチン）を加えた培地を用いる場合は、播種する胚性幹細胞の細胞密度が2500細胞/mL以上で培養することが好ましい。

【0097】無血清培地にSCGF及び細胞外マトリックス蛋白質とさらにSCF、FL、IL-3及びTPOから選ばれる少なくとも1つの蛋白質とを組み合わせる場合、特に、SCGF及び細胞外マトリックス蛋白質と(i)SCF、(ii)FLとIL-3とTPOとを組み合わせる場合、播種する胚性幹細胞の細胞密度が1500細胞/mL以上で培養することが好ましく、2000細胞/mL以上で培養することがさらに好ましい。

【0098】血清培地にSCGFを加えた培地を用いる場合は、播種する胚性幹細胞の細胞密度が500細胞/mL以上で培養することが好ましく、1000細胞/mL以上で培養することがさらに好ましい。胚性幹細胞よりEBを形成させることで、EBから目的とする分化細胞へ誘導することができる。

【0099】EBから目的の分化細胞への誘導は、公知の以下の報告に従って行うことができる。

【0100】T. C. Doetschmanら（J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985）、M. M. Shen & P. Leder（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 8240, 1992）、G.

Kellerら（Mol. Cell. Biol., 13, 473, 1993）の報告の方法によりEBから原始内胚葉（primitive endoderm）細胞へ分化誘導することができる。D. G. Wilkinsonら（EMBO J., 7, 691, 1988）、F. Pourtierら（Development, 113, 1105, 1991）、G. Kellerら（Mol. Cell. Biol., 13, 473, 1993）の報告の方法により、EBから遠位内胚葉（parietal endoderm）細胞へ分化誘導することができる。この分化誘導はレチノイン酸やLIFの添加により促進することができる（J. P. Fisherら；Exp. Cell Res., 182, 403, 1989）。T. C. Doetschmanら（J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985）、M. M. Shen & P. Leder（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 8240, 1992）、J. P. Fisherら（Exp. Cell Res., 182, 403, 1989）の報告の方法により、EBから近位内胚葉（visceral endoderm）細胞へ分化誘導することができる。ただし、この分化誘導は、レチノイン酸やLIFの添加により抑制される。T. C. Doetschmanら（J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985）、M. M. Shen & P. Leder（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 8240, 1992）の報告の方法により、EBから原始外胚葉（primitive ectoderm）細胞へ分化誘導することができる。ただし、この分化誘導は、LIFの添加により抑制される。

【0101】M. M. Shen & P. Leder（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 8240, 1992）、G. Kellerら（Mol. Cell. Biol., 13, 473, 1993）の報告の方法により、胚性幹細胞から形成されたEBより中胚葉前駆細胞（mesoderm precursor）へ分化誘導することができる。この分化誘導は、アクチビンA、BMP-4、bFGFの添加により促進することができる（G. Yamadaら；Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552, 1994；B. M. Johansson & M. V. Wiles；Mol. Cell. Biol., 15, 141, 1995）。R. Wang（Development, 114, 303, 1992）、Y. Shitayoshiら（Genes Cells 2, 213, 1997）の報告の方法により、EBから内皮細胞（endothelial cell）へ分化誘導することができる。W. Risauら（Development, 102, 471, 1988）、R. Wang（Development, 114, 303, 1992）、D. Vitterら（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 6273, 1997）の報告の方法によりEBから血管へ分化誘導することができる。また、T. C. Doetschmanら（J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985）、R. Wang（Development, 114, 303, 1992）、M. V. Wiles & G. Keller（Development, 111, 259, 1991）、H. R. Snodgrassら（J. Cell Biochem., 49, 225, 1992）、M. H. Lindenbaum & F. Grosfeld（Genes Dev., 4, 2075, 1990）の報告の方法によりEBから血島（blood island）等の造血が行われている組織や造血細胞へ分化誘導することができる。

【0102】この際、IL-11、IL-1、SCF、IL-6、VEGFの添加により造血前駆細胞への分化誘導を促進することができ（G. Kellerら；Mol. Cell.

Biol., 13, 473, 1993; L. G. Biesecker & S. G. Emerson; Exp. Hematol., 21, 774, 1993; M. Kennedyら; Nature, 386, 488, 1997) 、EPOの添加により赤血球系造血細胞への分化誘導を促進することができ (U. Burkettら; New Biol., 3, 698, 1991; M. V. Wiles & G. Keller; Development, 111, 259, 1991) 、IL-3、M-CSF、GM-CSFの添加により骨髓系造血細胞への分化誘導を促進することができ (M. V. Wiles & G. Keller; Development, 111, 259, 1991; M. H. Lindenbaum & F. Grosveld; Genes Dev., 4, 2075, 1990) 、IL-7やIL-2の添加、あるいは低酸素状態での培養によりリンパ系造血細胞への分化誘導を促進することができる (U. Chenら; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 2541, 1992; A. J. Potocnikら; EMBO J., 13, 5274, 1994; N. Nakayamaら; Blood, 91, 2283, 1998) 。また、VEGFの添加により、CD34陽性細胞への分化誘導を促進することができ、出現したCD34陽性細胞をM-CSF欠損マウス頭蓋冠由来のストローマ細胞OP9と共培養することによりBリンパ球やNK細胞に分化することができる (N. Nakayamaら; Blood, 91, 2283, 1998) 。さらに、VEGF、SCFおよび内皮細胞株であるD4T細胞の培養上清の添加により、血液細胞と内皮細胞の共通の前駆体細胞である血管芽細胞 (hemangioblast) への分化誘導を促進することができる (A. C. Schubertら; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96, 2159, 1999; K. Choiら; Development, 125, 725, 1998; M. Kennedyら; Nature, 386, 488, 1997) 。

【0103】T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) 、S. L. Leeら (J. Biol. Chem., 270, 9971, 1995) の報告の方法により、EBから軟骨細胞 (chondrocyte) へ分化誘導することができる。T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) 、W. C. Miller-Hanceら (J. Biol. Chem., 268, 25244, 1993) の報告の方法によりEBから骨格筋 (skeletal muscle) へ分化誘導することができる。T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) 、W. A. Ngら (Pediatr. Res., 41, 285, 1997) の報告の方法により、EBから平滑筋 (smooth muscle) へ分化誘導することができる。T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) の報告の方法により、EBから心筋 (cardiac muscle) へ分化誘導することができる。骨格筋、平滑筋、心筋への分化誘導は、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) やTGF- $\beta$ の添加により促進することができる (H. G. Slagerら; J. Cell. Physiol., 156, 247, 1993; J. Dinsmoreら; Cell Transplant., 5, 131, 1996) 。

【0104】S. Okabeら (Mech. Dev., 59, 89, 1996) 、G. Yamadaら (Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552, 1994) の報告の方法により、EBから神経性

外胚葉 (neural ectoderm) へ分化誘導することができる。T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) 、G. Bainら (Dev. Biol., 168, 342, 1995) の報告の方法により、EBから神経 (neuron) へ分化誘導することができる。S. Okabeら (Mech. Dev., 59, 89, 1996) 、G. Yamadaら (Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552, 1994) 、G. Bainら (Dev. Biol., 168, 342, 1995) の報告の方法により、EBからグリア細胞 (glial cell) へ分化誘導することができる。神経性外胚葉、神経、グリア細胞への分化誘導は、レチノイン酸 (retinoic acid) 、bFGF、NGFの添加により促進することができる。C. Baquettiら (Dev. Biol., 179, 184, 1996) の報告の方法により、EBから上皮細胞 (epithelial cell) へ分化誘導することができる。C. Baquettiら (Dev. Biol., 179, 184, 1996) の報告の方法により、EBからケラチノサイト (keratinocyte) へ分化誘導することができる。T. C. Doetschmanら (J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) の報告の方法により、EBからメラノサイト (melanocyte) へ分化誘導することができる。C. Daniら (J. Cell Sci., 110, 1279, 1997) の報告の方法により、EBから脂肪細胞 (adipocyte) へ分化誘導することができる。脂肪細胞への分化誘導は、レチノイン酸 (retinoic acid) の添加により促進することができる。

【0105】以上の報告に記載された方法を本発明のEB形成方法の後に行う、あるいは、本発明のEB形成方法と組み合わせて同時に行うことで、目的とする分化細胞を効率よく誘導することができる。本発明の方法で形成したEBをトリプシン-EDTA処理等ではばらばらにした後、回収した細胞を血清、IL-3、EPO、GM-CSFおよびTPOを含む培地で培養することにより、造血幹細胞を効率よく誘導することができる。同様にして該EBから回収した細胞を血清およびIL-7を含む培地で培養することにより、B細胞を誘導することができる。また、同様にして該EBから回収した細胞を血清およびVEGFを含む培地で培養することにより血管内皮細胞を効率よく誘導することができる。血管内皮細胞を誘導する場合は、フィブロネクチンでコートした培養器上で培養することが好ましい。また、以上の分化細胞の誘導方法において、該EBから回収した細胞の培養により得られた細胞のコロニーを、トリプシン-EDTA処理等ではばらばらにした後、再度同じ組成の培地 (造血幹細胞の場合は血清、IL-3、EPO、GM-CSFおよびTPOを含む培地、B細胞の場合は血清およびIL-7を含む培地、血管内皮細胞の場合は血清およびVEGFを含む培地) で培養することにより、さらに多数の造血幹細胞、B細胞および血管内皮細胞を誘導することができる。以上の分化細胞の誘導方法においては、胚性幹細胞をSCGFまたはBMP-4のいずれかと細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地で培養す



ることにより形成されたEBよりも、胚性幹細胞をSCGF、BMP-4および細胞外マトリックス蛋白質を含む無血清培地で培養することにより形成されたEBを用いる方が、さらに効率的に造血幹細胞、B細胞および血管内皮細胞を誘導することができる。

【0106】胚性幹細胞は初期胚より樹立され、全能性を持つ未分化な幹細胞として一時的に発生を止めた状態で維持されている。胚性幹細胞が凝集しEBを形成すると、あたかも初期胚の状態に戻ったかのように分化が誘導され外胚葉細胞、内胚葉細胞、中胚葉細胞などが出現する。上述の報告の様に、EB形成後、あるいはその過程において、特定の機能性細胞の分化や増殖を促進あるいは抑制する因子が作用すると分化細胞出現数やその効率に大きな影響を与えることが知られている。本発明のEB形成方法により無血清培養条件及び/又は血清培養条件において効率的なEB形成が可能となり、上述の公知の方法と組み合わせることにより所望の分化した機能性細胞を効率的にかつ多量に得ることができる。以下、本発明のEB形成方法と、該方法を工程として含む胚性幹細胞の分化誘導法をまとめて、本発明の培養方法とい

う。

【0107】分化した細胞の精製方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、その具体的例として、フローサイトメーターを用いた方法 (Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988); Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996); Int. Immunol., 10, 275, (1998); Exp. Hematol., 25, 972, (1997))、パニング法 (Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996); J. Immunol., 141, 2797, (1988))、シグナル強度の密度差を利用した細胞分画法 (組織培養の技術 (第三版), 朝倉書店 (1996)) を挙げることができる。

【0108】4. 本発明の培養方法、細胞、分化誘導剤の利用

(1) 本発明の培養方法の利用

本発明の培養方法では、外胚葉細胞、中胚葉細胞、内胚葉細胞、外胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞または内胚葉由来の細胞を胚性幹細胞から分化誘導することができる。これら細胞の分化過程における生理活性物質 (例えば、薬物) や機能未知の新規遺伝子産物などの薬理評価および活性評価に有用である。また、特定の遺伝子を改変した胚性幹細胞を用いることにより、幹細胞が外胚葉および外胚葉由来の細胞へ分化していく過程における、該遺伝子の機能評価にも有用である。

【0109】本発明の培養方法の利用方法としては、例えば、以下のものが挙げられる。

(a) 本発明の培養方法を用いた、胚性幹細胞から機能性細胞への分化調節に関連する物質の評価方法および薬剤のスクリーニング方法

【0110】本発明の培養方法を用いることにより、培地中に添加した被験物質の胚性幹細胞から機能性細胞への分化の過程に及ぼす影響を評価することができる。被験物質としては、培養系に加えることができるものであればどのようなものでもよく、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などが挙げられる。遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに挿入して培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。その具体的例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733, 1995; Nucleic Acids Res., 18, 3587, 1990; Nucleic Acids Res., 23, 3815, 1995) を挙げることができる。被験物質の評価は、例えば、胚性幹細胞から機能性細胞への分化効率の質的または量的な変化を測定することで行なうことができる。

【0111】(b) 本発明の培養方法を用いた、胚性幹細胞から分化誘導した機能性細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法および薬剤のスクリーニング方法。本発明の培養方法を用いることにより、培地中に添加した被験物質の胚性幹細胞から分化誘導した機能性細胞の機能の調節に及ぼす影響を評価することができる。被験物質としては、培養系に加えることができるものであればどのようなものでもよく、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などが挙げられる。遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに挿入して培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。その具体的例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733, 1995; Nucleic Acids Res., 18, 3587, 1990; Nucleic Acids Res., 23, 3815, 1995) を挙げることができる。被験物質の評価は、胚性幹細胞から分化誘導した機能性細胞の機能の質的または量的な変化を測定することで行なうことができる。具体的な例としては、例えば、胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞を用いて活動電位を測定するvan Inzenらの方法 (Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21, 1996) が挙げられる。

【0112】(2)本発明の細胞を含有する医薬  
発生工学技術により、個々人の胚性幹細胞を作成するこ  
とも可能である。1997年、Wilmutらによって哺乳動物で  
はじめて、体細胞の核由来のクローン個体である羊ドリ  
ーが作出されて以来 (I. Wilmutら; Nature, 385, 810,  
1997)、胎児細胞の核を用いたクローンウシ (J. B. C  
ibelliら; Science, 280, 1256, 1998)、皮膚、筋肉、  
耳鼓、卵管、卵丘細胞の核を用いたクローンウシ (入谷  
明; 蛋白核酸酵素, 44, 892, 1999)、クローンヤギ

(A. Baquistら; Nature Biotechnology, 17, 455, 1999) 10  
、卵丘細胞の核を用いたクローンマウス (T. Wakaya  
maら; Nature, 394, 369, 1998)、雄の尾の細胞を用い  
たクローンマウス (T. Wakayamaら; Nature Genetics,  
22, 127, 1999)、胚性幹細胞の核を用いたクローンマ  
ウス (T. Wakayamaら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9  
6, 14984, 1999; W.M. Rideout IIIら; Nature Genetic  
s, 24, 109, 2000)の作出が報告されており、体細胞の  
核を移植した受精卵に導入することで哺乳動物のクロー  
ン個体を作成することが可能であることが示されてい  
る。この核移植の技術と胚性幹細胞を樹立する技術を組  
み合わせることで個々人の胚性幹細胞の作成が可能であ  
り、個々人の胚性幹細胞から分化させた細胞は臓器移植  
へ応用することができる (R. P. Lanzaら; Nature Medi  
cine, 5, 975, 1999)。また、胚性幹細胞に遺伝子操作  
を加えることで、より効果的な遺伝子治療を行うこと  
や、組織適合性抗原の改変が可能となる (P. D. Rathie  
nら; Reprod. Fertl. Dev., 10, 31, 1998)。

【0113】本発明の、胚性幹細胞から分化誘導した外  
胚葉および外胚葉由来の細胞は、外胚葉由来の細胞の障  
害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。ま  
た、本発明の、胚性幹細胞から分化誘導した中胚葉お  
よび中胚葉由来の細胞は、中胚葉由来の細胞の障害に基  
づく疾患の治療薬として用いることができる。さらに、本  
発明の、胚性幹細胞から分化誘導した内胚葉および内  
胚葉由来の細胞は、内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾  
患の治療薬として用いることができる。

【0114】外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患とし  
ては、神経組織、松果体、副腎髄質、色素細胞あるいは  
表皮組織を構成する細胞の障害に基づく疾患が挙げられ  
る。

【0115】神経組織を構成する細胞の障害に基づく疾  
患としては、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、  
パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、ダウン症候  
群、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経外傷、神  
経毒物の障害に起因する疾患などが、松果体を構成する  
細胞の障害に基づく疾患としては、松果体症、松果体機  
能不全などが、副腎髄質を構成する細胞の障害に基づく  
疾患としては、副腎機能欠如症、副腎炎などが、色素細  
胞の障害に基づく疾患としては、色素異常症、色素過剰  
症などが、表皮組織を構成する細胞の障害に基づく疾患

としては火傷、外傷、創傷治癒、床ずれ、皮膚炎、表皮  
症、乾せんなどが挙げられる。

【0116】中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患とし  
ては、筋組織、結合組織、骨組織、軟骨組織、循環器、  
血液組織、真皮、泌尿器あるいは生殖器を構成する細胞  
の障害に基づく疾患が挙げられる。

【0117】筋組織を構成する細胞の障害に基づく疾患  
としては、筋肉不全症、筋緊張症、重症筋無力症など  
が、結合組織を構成する細胞の障害に基づく疾患として  
は、結合組織病、結合組織炎、糖尿病などが、骨組織を  
構成する細胞の障害に基づく疾患としては、骨粗鬆症、  
骨関節炎、骨形成異常症、骨硬化症、骨髓炎、骨形成不  
全症などが、軟骨組織を構成する細胞の障害に基づく疾  
患としては、変形関節炎、慢性関節リウマチ、軟骨形成  
不全症、軟骨発育不全症、軟骨形成異常症などが、循環  
器を構成する細胞の障害に基づく疾患としては、心筋梗  
塞、脳梗塞、末梢血管閉塞症、SLE、狭心症、高血圧  
症、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、  
動脈硬化、再狭窄、血栓、虚血性心疾患、虚血性脳疾  
患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害などが、血液組織  
を構成する細胞の障害に基づく疾患としては、HIV感  
染、敗血症、移植片対一宿主疾患、アレルギー、アト  
ピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患などが、  
真皮を構成する細胞の障害に基づく疾患としては、火  
傷、外傷、皮膚炎、乾せんなどが、泌尿器を構成する細  
胞の障害に基づく疾患としては、溶血性尿毒症症候群、  
腎炎などが、生殖器を構成する細胞の障害に基づく疾患  
としては、性器発育不全症、性器発育異常などが挙げら  
れる。

【0118】内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患とし  
ては、消化管、呼吸器、胸腺、甲状腺、副甲状腺、膀  
胱、中耳、肝臓あるいは脾臓を構成する細胞の障害に基  
づく疾患が挙げられる。

【0119】消化管を構成する細胞の障害に基づく疾患  
としては、胃潰瘍、胃炎、十二指腸潰瘍などが、呼吸器  
を構成する細胞の障害に基づく疾患としては、肺炎、肺  
水腫、肺炎、気管支炎、気管支喘息などが、胸腺を構  
成する細胞の障害に基づく疾患としては、胸腺炎、胸腺  
リンパ形成不全症、胸腺機能減退症などが、甲状腺を構  
成する細胞の障害に基づく疾患としては、甲状腺無形成  
症、甲状腺機能不全症などが、副甲状腺を構成する細胞  
の障害に基づく疾患としては、副甲状腺機能低下症など  
が、膀胱を構成する細胞の障害に基づく疾患としては、  
膀胱炎、膀胱破裂などが、中耳を構成する細胞の障害に  
基づく疾患としては、中耳炎などが、肝臓を構成する細  
胞の障害に基づく疾患としては、肝臓癌、慢性B型  
肝炎、C型肝炎などが、脾臓を構成する細胞の障害に基  
づく疾患としては、糖尿病などが挙げられる。

【0120】外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治  
療薬、中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬、

又は内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬としては、移植医療に利用可能な、障害を受けた細胞の機能と同じ機能を有する細胞、障害を受けた細胞の前駆細胞、障害を受けた細胞の機能を代償する細胞、障害を受けた細胞の再生を促進する機能を有する細胞が用いられる。該治療薬は、本発明の方法を用いることにより、ES細胞より分化誘導し精製することにより製造できる。

【0121】該治療薬は、移植医療の目的に用いられる場合、血清やウイルス等の不純物の混入が無いことが求められる。本発明の方法によれば、無血清培養条件下で、外胚葉細胞、中胚葉細胞、内胚葉細胞、外胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞または内胚葉由来の細胞を分化誘導することができるため、移植医療の目的に適している。

【0122】細胞の精製方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができる。その具体例として、フローサイトメーターを用いた方法 (Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988); Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996); Int. Immunol., 10, 275, (1998). Exp. Hematol., 25, 972, (1997))、パニング法 (Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996); J. Immunol., 141, 2797, (1988))、ショ糖濃度の密度差を利用した細胞分画法 (組織培養の技術 (第三版), 朝倉書店 (1996)) を挙げることができる。

【0123】移植の方法としては、対象となる疾患に適した方法であればいずれの方法も用いることができ、疾患ごとにそれぞれの疾患に適した公知の方法が知られている。例えば、パーキンソン病患者に対する中絶胎児の脳細胞を移植する方法として知られている、Nature Neuroscience 2, 1137, 1999等に記載の方法が挙げられる。

【0124】(3) 本発明の分化誘導剤を含有する医薬本発明の分化誘導剤は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬、中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬、あるいは内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。

【0125】外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患、中胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患、内胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、4. (2) に記載した疾患が挙げられる。

【0126】本発明の分化誘導剤を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一

つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生体的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0127】投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0128】経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、 $\alpha$ -ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0129】非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該有効成分そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該有効成分および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤に添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0130】投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0131】本発明に係わる適用動物としては、脊椎動物、中でも温血動物、さらにはマウス、ラット、モルモ

19

20

30

40

50

ット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒト等の哺乳動物あるいはニトリが挙げられる。

【0132】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0133】

##### 【実施例】実施例1 E Bの無血清培養

胚性幹細胞として、129/SvJマウスの胎生3.5日胚の内部細胞塊より樹立されたES細胞GSI-1 (Genome Systems Inc.社製) (以下、単に「ES細胞」ともいう)を用い、各種無血清培養条件下でEBを形成させその培養の持続性を試験した。

【0134】ES細胞GSI-1は、Dulbecco MEM培地 (Life Technologies社製) に16%の牛胎児血清 (fetal calf serum; Hyclone社製)、2mMグルタミン、100μM MEM Non-Essential Amino Acids溶液、10mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、100μM 2-メルカプトエタノールおよび1,000U/mL LIF (ESG 20 PD Murine LIF; ライフテックオリエンタル株式会社製) を加えた培地 (以下、「ES培地」と呼ぶ) を用い、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) に記載の方法に従い、フィーダー細胞上で未分化な形質を保ちながら培養したものを実験に供した。

【0135】フィーダー細胞は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) に記載の方法に準じ、Dulbecco MEM培地 (Life Technologies社 30 製) に10%の牛胎児血清 (fetal calf serum; Hyclone社製)、2mMグルタミン、100μM MEM Non-Essential Amino Acids溶液および100μM 2-メルカプトエタノールを加えた培地 (以下、「MEF培地」と呼ぶ) を用いてほぼコンフルエント状態にまで培養したマウス胎児初代培養繊維芽細胞MEF (mouse embryonic fibroblast; ライフテックオリエンタル株式会社製 商品番号YE9284600) を、Dulbecco MEM培地 (GIBCO/BRL社製) に5%の牛胎児血清 (fetal calf serum; Hyclone社製)、2mMグルタミン、100μM MEM Non-Essential Amino Acids溶液、100μM 2-メルカプトエタノールおよび10μg/mL マイトマイシンCを加えた培地で2.5時間培養し、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 不含リン酸バッファー (GIBCO/BRL社製、以下「PBS (-)」と呼ぶ) 溶液で3回洗浄後、1mMEDTAおよび0.25%トリプシンを含むPBS (-) 溶液を加え単細胞状態にし、MEF培地に懸濁後、約100,000細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度でゼラチンコートした培養器に播種し、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて1日間培養したものを実験に

用いた。

【0136】ES細胞の無血清培養は以下のように行った。IMDM培地 (GIBCO/BRL社製) に50μM 2-メルカプトエタノール、2mMグルタミン、1%牛血清アルブミン (Stem Cell Technologies社製)、10μg/mL 牛胰岛素 (Stem Cell Technologies社製)、200μg/mL ヒトトランスフェリン (Stem Cell Technologies社製) および40μg/mL 低比重リポ蛋白質 (low density lipoprotein; LDL, Sigma社製) を加えた培地 (以下、「無血清基本培地」と呼ぶ) を基本培地として用い、この無血清基本培地に各種蛋白性因子を添加した培地を調製し、2,000細胞/mLの細胞密度でES細胞を懸濁し、6穴プレートに1mLずつ播種後、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターで20日間培養を行い、EBの形成の有無、数、形態の変化等を倒立顕微鏡下で観察した。EBを染色する場合には、メイギムザ染色法を用いて行った。

【0137】ES細胞は、無血清培養開始の2日前に、コンフルエント密度の10分の1になるように継代した細胞を、PBS (-) で2回洗浄後、1mMEDTAおよび0.25%トリプシンを含むPBS (-) 溶液を加え37℃で5分間インキュベーションを行うことで単細胞状態にし、各種蛋白性因子を添加した無血清基本培地に2,000細胞/mLの細胞密度に懸濁したものを調製して実験に用いた。

【0138】6穴プレートは、市販の細胞培養用プレート (岩城硝子株式会社製)、コラーゲンType I コートプレート (岩城硝子株式会社製)、コラーゲンType IV コートプレート (岩城硝子株式会社製)、ゼラチンコートプレート (岩城硝子株式会社製)、フィブロネクチンコートプレート (BECTON DICKINSON社製 BIOCOT Cellware)、ラミニンコートプレート (BECTON DICKINSON社製 BIOCOT Cellware)、または、ポリ-D-リジンコートプレート (BECTON DICKINSON社製 BIOCOT Cellware) を実験に用いた。

【0139】蛋白性因子は、マウス造血幹細胞増殖因子 (mouse stem cell growth factor; 以下SCGFとも略す)、マウス造血幹細胞因子 (mouse stem cell factor; 以下SCFとも略す、R&D Systems社製)、マウスFlk-2/flt3リガンド (mouse Flk-2/flt3 ligand; 以下FLとも略す、R&D Systems社製)、マウスインターロイキン3 (mouse interleukin 3; 以下IL-3とも略す、R&D Systems社製)、マウス trombopoietin (mouse thrombopoietin; 以下TPOとも略す、R&D Systems社製)、マウス血管内皮増殖因子 (mouse vascular endothelial growth factor; 以下VEGFとも略す、Pepro Tech社製)、ヒトエリスロポイエチン (human erythropoietin; 以下EPOとも略す、キリンビール株式会社製)、マウスインターロイキン6 (mouse in

terleukin 6; 以下IL-6とも略す、Pepro Tech社製)、または、マウスインターロイキン11 (mouse interleukin 11; 以下IL-11とも略す、R&D Systems社製)を単独あるいは複数を無血清基本培地に添加し実験に用いた。各種蛋白性因子SCGF、SCF、FL、IL-3、TPO、VEGF、EPO、IL-6、およびIL-11の無血清基本培地への添加濃度はそれぞれ、50ng/mL、50ng/mL、50ng/mL、50ng/mL、50ng/mL、10ng/mL、1unit/mL、10ng/mL、50ng/mLとした。なお、SCGFは参考例1で調製したものを

用いた。  
【0140】20日間培養を行った結果を図1に示した。細胞培養用プレートあるいはポリ-D-リジンコートプレートを用いて培養を行った場合には、上述の各種蛋白性因子を添加してもEBの形成は全く観察されなかった。また、細胞外マトリックス蛋白質をコートしたプレートでも、無血清基本培地に上述の蛋白性因子を添加しない場合には、EBの形成は全く観察されなかった。一方、上述の蛋白性因子を添加した無血清基本培地を用いた場合には、フィブロネクチンを筆頭に、以下ゼラチン、コラーゲンタイプIV、コラーゲンタイプI、ラミニンでコートしたプレートの順に良好なEBの形成が観察され、SCGF、SCF、FL、IL-3およびTPOらの蛋白性因子が良好なEBの出現に効果的である可能性が示唆された。図2にフィブロネクチンコートプレートでのEBの出現の様子を示した。

【0141】実施例2 EB形成の経時変化  
無血清培養下でのEBの形成の様子を観察するために、フィブロネクチンコートしたプレートと、SCGF、SCF、FL、IL-3、TPO、IL-6およびIL-11を添加した無血清基本培地を用い、実施例1に記載の方法に従ってES細胞GSI-1の無血清培養を行った。

【0142】ES細胞は、播種後4日目頃からプレートの底部で小さなコロニーを形成し始め、12日目には大きなEBへと成長していった。成長したEBはその後20日を越えて維持された。図3に12日目のEBの写真を示した。

【0143】実施例3 EBの形成に影響を与える蛋白性因子の解析—その1: 無血清培地に添加する蛋白性因子について—

EBの形成に影響を与える蛋白性因子について解析するために、フィブロネクチンコートしたプレートと、SCGF、SCF、FL、IL-3あるいはTPOの各因子を単独または複数添加した無血清基本培地を用い、実施例1に記載の方法に従ってES細胞GSI-1の無血清培養を行った。

【0144】結果を図4に示した。上記蛋白性因子を単独で加えた場合にはEBの形成は観察されなかった。2因子を組み合わせた場合には、SCGFとSCFを組み

合わせた場合のみでEBの形成が観察された。3因子を添加した培地を用いた場合には、SCGF、SCF及びFLの組み合わせ、SCGF、SCF及びIL-3の組み合わせ、SCGF、SCF及びTPOの組み合わせの場合にEBの形成が観察された。4因子を添加した培地を用いた場合には、SCGF、SCF、FL及びIL-3の組み合わせ、SCGF、SCF、FL及びTPOの組み合わせ、SCGF、SCF、IL-3及びTPOの組み合わせ、SCGF、FL、IL-3及びTPOの組み合わせの場合にEBの形成が観察された。以上の結果から、無血清培養条件下でEBを形成させるには、SCGF、SCF、FLの蛋白性因子が特に重要であることが明らかになった。

【0145】実施例4 EBの形成に影響を与える蛋白性因子の解析—その2: プレートをコートする細胞外マトリックス蛋白質について—

EBの形成に影響を与える蛋白性因子について解析するために、SCGFとSCFを添加した無血清基本培地と、フィブロネクチンコートプレートあるいは通常の細胞培養用プレートを用い、実施例1に記載の方法に従ってES細胞GSI-1の無血清培養を行った。この際、ES細胞の播種細胞濃度を変化させることで細胞密度の影響も合わせて検討した。

【0146】まず、フィブロネクチンコートプレートを用いてEBを出現させた場合に、播種細胞濃度がどのような影響を示すか検討した(図5)。無血清基本培地にSCGFとSCFを添加した培地を用いた場合には、播種細胞濃度1,500細胞/mLの培養からEBの形成が観察され、播種細胞濃度4,000細胞/mLで培養した場合に35個のEBの形成が観察された。播種細胞濃度を5,000細胞/mL以上になると、生じてきたEBがお互いに融合し計測が不可能となった。また、無血清基本培地のみを用いた場合でも、播種細胞濃度2,500細胞/mL以上からEBの形成が観察されたが、このEBの形成効率はSCGFとSCFを添加した無血清基本培地を用いた場合に比べて明らかに低かった。

【0147】次に、通常の細胞培養用プレートと無血清基本培地を用い、ES細胞の播種細胞濃度を変えてEBが出現するか否かを検討した。フィブロネクチンコートプレートを用いた場合とは異なり、播種細胞濃度1,500細胞/mL、2,000細胞/mL、2,500細胞/mL、3,500細胞/mL、4,000細胞/mLのいずれの場合にもEBの形成は観察されなかった。

【0148】以上の結果から、無血清培養条件下でEBを形成させるには、SCGF、SCF、フィブロネクチンの蛋白性因子が重要であることが明らかになった。

【0149】実施例5 血清培地中でのEBの形成  
上述した無血清培地でのEBの形成効率を、血清培地を用いた場合と比較するために、Dulbecco MEM培地(GIBC O/BRL社製)に20%の牛胎児血清(fetal calf serum;

Hyclone社製)、2 mMグルタミン、100  $\mu$ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、10 mM HEPES、100  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを加えた血清培地を用い、ES細胞GSI-1の培養を以下に行った。

【0150】ES細胞は、試験開始の2日前に、コンフルエント濃度の10分の1になるように継代した細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、1 mM EDTAおよび0.25%トリプシンを含むPBS(-)溶液を加え37℃で5分間インキュベーションを行うことで単一細胞状態にし、上述の血清培地に2,000細胞/mLの細胞濃度に懸濁したものを調製して実験に用いた。2,000細胞/mLの細胞濃度に調製したES細胞を、市販の細胞培養用6穴プレート(岩崎硝子株式会社製)に1 mLずつ接種後、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターで20日間培養を行い、形成されたEBの数を倒立顕微鏡下で観察した。

【0151】形成されたエンブリオイドボディの数は、血清のロットによって変動する傾向が観察されたが、低い場合で4個、平均で12個程度であった。

【0152】実施例6 血清培地中でのEBの形成に及ぼす蛋白性因子の効果

無血清培養でのEBの形成に効果のあった蛋白性因子が、血清培養でも効果を有するか検討するために、蛋白性因子を添加した血清培地を用いてES細胞の培養を行った。

【0153】蛋白性因子としては、SCGF、SCF、FL、IL-3、TPOを用いた。実施例5に記載の方法に従い、上記蛋白性因子を単独あるいは複数添加した血清培地を用い、ES細胞GSI-1の培養を行った。各蛋白性因子の添加濃度は実施例1に記載した濃度とした。

【0154】図6に出現したEBの数を経時的に観察した結果を示した。SCGFを添加した培地を用いたところ、顕著なエンブリオイドボディの形成促進の効果が観察された。一方、SCF、FL、IL-3およびTPOを添加した培地を用いた場合には若干のEBの形成促進の効果が観察されたが、SCGF単独の効果には及ばなかった。さらに、SCGFを添加した培地にSCF、FL、IL-3およびTPOを加えても、SCGF単独の場合と比べて有為な効果は観察されなかった。以上の結果から、SCGFは強いエンブリオイドボディの形成促進効果を有しているものと示唆された。

【0155】実施例7 SCGF添加無血清培養により形成されたEBからの分化細胞の増殖

実施例1に記載の方法に従い、フィブロネクチンコートした6穴プレートを用いて、ヒトSCGF(参考例2に従って調製したものをを用いた)、マウスSCGF、マウスSCFの各因子を単独または複数添加した無血清基本培地(因子無添加、マウスSCGF、ヒトSCGF、マウスSCF、マウスSCGFおよびSCF、ヒトSCGFおよびマウスSCF)を用いて、マウスES細胞GSI-

1の無血清培養を行った。各因子の添加濃度は全て50 ng/mLずつで行った。ただし、縮種するES細胞の濃度は3500細胞/mLで行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターで12日間培養を行った。形成されたEBの数は、マウスSCGFおよびマウスSCFを添加した培養あるいはヒトSCGFおよびマウスSCFを添加した培養で他の培養よりもやや数が多かったが、どの培養においても10個前後であった。

【0156】各培養ごとに、形成された全てのEBをPBS(-)で2回洗浄後、0.05%トリプシンを含む0.53 mmol/L EDTA(GIBCO/BRL社製)で37℃、8~10分消化した。剥離した単一細胞全量を10%牛胎児血清(fetal calf serum; 以下FCSと略す、Stem Cell Technologies社製)添加IMDM培地(GIBCO/BRL社製)に容積1.5 mLになるように浮遊させた。この回収細胞浮遊液の0.4 mLに、50 ng/mLマウスIL-3、1 unit/mLヒトEPO、20 ng/mLマウスGM-CSF(Pepro Tech社製)、20 ng/mLマウスTPO(各因子の濃度は回収細胞浮遊液に加えて2 mLになったときの濃度を示した)をそれぞれ含む20%FCS添加IMDM培地(以下、この培地を造血因子添加培地と称する)1.6 mLを加えて細胞培養用6穴プレート(Costar社製)にそれぞれ接種し、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターで7~10日間培養を行い、生じたコロニー(以下、EBに由来する細胞の培養から生じたコロニーを2次分化コロニーとよぶこともある。)の細胞をメイ-グリュンワルト-ギムザ(May-Grunwald-Giemsa)染色し、コロニー数を数えた。その結果を図9および図10に示したが、マウスSCGFまたはヒトSCGFをES細胞に添加した培養により形成されたEBからは、細胞が増殖し100~160個程度の多数のコロニーが生じたのに対し、マウスSCFのみを添加した培養により形成されたEBからは、20個以下の少数のコロニーしか生じず、無血清基本培地のみ(因子無添加)の培養により形成されたEBからはコロニーが生じなかった。また、ヒトまたはマウスSCGFとマウスSCFを共に添加した培養とヒトまたはマウスSCGFを単独で添加した培養からそれぞれ形成されたEBから生じたコロニー数に大きな差は見られなかった。このことから、ES細胞の無血清培養により形成されたEBに分化因子を加えて培養し、細胞の分化を誘導し増殖させるためには、ES細胞の培養時にSCGFを存在させることが重要であり、SCFは必ずしも必要でないこと、EBの形成時に、SCGFは単独でES細胞から分化した細胞への方向づけ(プライミング)をできることがわかった。また、マウスES細胞に対してはSCGFであれば種差はなく、マウスSCGFであってもヒトSCGFであっても同様の効果を示すことが見出された。

【0157】なお、EBから回収した細胞の培養をFCS非添加（造血因子は添加）の条件あるいは、造血因子非添加（FCSは添加）の条件で行った場合は、どちらの条件でも、ヒトまたはマウスSCGFを添加した無血清培養により形成されたEBからの2次分化コロニーの形成は殆ど見られなかった。造血因子非添加の条件で培養を行った結果を図11に示す。ヒトまたはマウスSCGFを添加した無血清培養により形成されたEBから生じたコロニーは1個あたり1.5〜3.0×10<sup>4</sup>個の細胞からなっており、そのメイグリュンワルトーギムザ染色したサイトスピン標本の顕微鏡観察から、核/細胞質比の大きな好塩基性細胞質の小円型未熟細胞や核/細胞質比の小さな顆粒や空胞を有する細胞質の大型細胞など多彩な細胞から構成されていることがわかった。図12にヒトSCGF単独添加培養により形成されたEBから生じたコロニーにおいて観察された種々の細胞を示す。

【0158】実施例8 SCGFまたはBMP-4添加無血清培養により形成されたEBからの造血幹細胞の取得

(1) SCGFまたはBMP-4添加無血清培養により形成されたEBからの造血幹細胞への分化  
個体発生過程で胎生期の造血分化誘導に影響することが知られているBMP-4をES細胞の培養時に添加した場合、EBからの造血分化へのプライミングの効果を以下のようにして検証した。実施例7と同様にしてES細胞GSI-1の無血清培養を行い、EBを形成させた。ただし、培地は、ヒトSCGF、ヒトBMP-4（R&D Systems社製）の各因子をそれぞれ単独または両者とも添加した無血清基本培地を用い、各因子の添加濃度は全

て50ng/mLずつで行った。形成したEBの数は、どの培養でも10個前後で差はなかった。実施例7と同様にして、それぞれのEBから細胞浮遊液1.5mLを回収し、その0.4mLに、(a)造血因子添加培地または(b)50ng/mLヒトSCGFを含む造血因子添加培地1.6mLを加えて、実施例7と同様に培養し、生じた2次分化コロニーの細胞の染色を行い、コロニー数を数えた。その結果、図13に示すように、いずれのEBからも造血因子の添加培養により、多数のコロニーが生じ、SCGFだけでなくBMP-4によっても分化へのプライミングができることがわかった。なお、各EBとも(a)と(b)の培地でコロニー数に差はなく、2次分化コロニーの形成時におけるSCGFの添加によるコロニー数の増加はみられなかった。

【0159】それぞれのEBの細胞を、上記の(a)造血因子添加培地または(b)造血因子+ヒトSCGFの添加培地で培養した場合に生じた、2次分化コロニーの細胞の細胞膜表面形質を、EPICS XL フローサイトメーター（Coulter 社製）を用いたシングルカラーフローサイトメトリーにより解析した。解析は、2次分化コロ

ーの細胞について、まず前方および側方散乱光を測定し、それぞれ規定の数値内の細胞群を回収し行った。標識抗体は、FITC標識抗B220抗体（Calta社製）、FITC標識抗Sca-1抗体（Calta社製）、R-PE標識抗CD117（c-kit）抗体（Calta社製）、R-PE標識抗CD34抗体（Calta社製）の各ラットモノクローナル抗体を用いた。同時に各抗体のFITCあるいはR-PE標識ラットアイソタイプIgG2aあるいはIgG2b（いずれもCalta社製）を陰性対照として解析し、陰性対照で得られる最大蛍光強度以上に染色される細胞を陽性とし、解析全細胞に占める陽性細胞率を測定した。各抗体との反応は各メーカー指定の方法に従った。

【0160】その結果、造血幹細胞に特異的な細胞膜表面形質であるSca-1は8〜14%の細胞に、CD34は2〜6%の細胞に、CD117は10〜14%の細胞に陽性で、少数のB細胞系B220陽性細胞も認められた。図14にヒトSCGFおよびヒトBMP-4添加無血清培養により形成されたEBに由来する細胞を造血因子添加培地で培養した場合、2次分化コロニーの細胞膜表面形質の解析を示した。これら陽性細胞の実数を計算すると、図15に示すように、ES細胞3500個から、SCGF単独、BMP-4単独または両者の併用により、それぞれ4〜8×10<sup>4</sup>個のSca-1陽性細胞、1〜4×10<sup>4</sup>個のCD34陽性細胞、4〜7×10<sup>4</sup>個のCD117陽性細胞が得られたことになる。以上のように、SCGFまたはBMP-4を添加した培養によりES細胞から形成したEBを適当な造血因子（IL-3、EPO、GM-CSFおよびTPO）と血清を添加した培地で培養することにより、ES細胞は造血幹細胞に分化し、大量の造血幹細胞を取得できることが見出された。

【0161】(2) 2次分化コロニーの細胞の培養  
さらに、上記の各培養条件で得られた2次分化コロニーから、実施例7のEBと同様にして細胞浮遊液を回収し、2次分化コロニーの形成時と同様の条件で培養を行ったところ、生じるコロニー（以下、このような2次分化コロニーの細胞の培養により生じたコロニーを3次分化コロニーとも称する。）の数はさらに増加した（図16）。3次分化コロニーの数は、ES細胞の無血清培養時に添加する因子が、SCGF<BMP-4<SCGF+BMP-4の順に増加した。この傾向は、図17に示したコロニーを構成する細胞のメイグリュンワルトーギムザ染色したサイトスピン標本の顕微鏡観察でも明瞭であった。3次分化コロニーを構成する細胞は2次分化コロニーの構成細胞と同様、各種細胞からなる不均一な細胞集団であった。

【0162】以上のようにして得られた3次分化コロニーの構成細胞の細胞膜表面形質を、(1)と同様にし、シングルカラーフローサイトメトリーにより解析し

た。その結果、Sca-1は9~19%の細胞に、CD34は10~26%の細胞に、CD117は14~18%の細胞に陽性で、少数のB220陽性細胞も認められた。図18にヒトSCGF添加無血清培養から形成されたEBに由来する細胞の造血因子添加培地による培養で得られた2次分化コロニーの細胞を、さらに造血因子添加培地で培養した場合の3次分化コロニーの構成細胞の細胞膜表面形質の解析を示した。全体に造血幹細胞特異的な細胞膜表面形質の陽性率は2次分化コロニーの構成細胞を上回っていたが、特にCD34陽性細胞の増加が顕著であった。これら陽性細胞を算数と計算すると、図19に示すように、ES細胞3500個から、SCGF単独、BMP-4単独または両者の併用により、それぞれ5~20×10<sup>3</sup>個のSca-1陽性細胞、5~25×10<sup>3</sup>個のCD34陽性細胞、5~15×10<sup>3</sup>個のCD117陽性細胞が得られたことになる。特に、BMP-4とSCGFの両者を添加したES細胞の培養から得られた陽性細胞数は、それぞれの因子単独の添加の場合の3~5倍に上昇した。

【0163】実施例9 SCGFまたはBMP-4添加無血清培養により形成されたEBからのB細胞の分化  
実施例8(1)と同様にして、ヒトSCGF、ヒトBMP-4の各因子をそれぞれ単独または両者とも添加した無血清基本培地を用いてES細胞GSI-1からEBを形成させた。実施例7と同様にして、それぞれのEBから細胞浮遊液1.5mLを回収し、その0.4mLに、50ng/mL(回収細胞浮遊液に加えて2mLになったときの濃度)マウスIL-7を含む20%FCS添加IMDM培地1.6mLを加えて、実施例7と同様に培養した。その結果、いずれのEBからも多数の2次分化コロニーが生じることがわかった。さらに、上記の各培養条件で得られた2次分化コロニーから、実施例8(2)と同様にして3次分化コロニーを形成させたところ、図20に示すように、コロニーの数はさらに増加した。この3次分化コロニーの構成細胞の細胞膜表面形質を、実施例8(1)と同様にして、FITC標識抗B220ラットモノクローナル抗体(Caltag社製)抗体を用いたシングルカラーフローサイトメトリーにより解析した。その結果、図21に示すように、B細胞系の細胞に特異的な細胞表面形質B220の陽性細胞が認められ、B細胞系の細胞を得ることができるとわかった。

【0164】実施例10 SCGFまたはBMP-4添加無血清培養により形成されたEBからの血管内皮細胞の分化  
実施例8(1)と同様にして、ヒトSCGF、ヒトBMP-4の各因子をそれぞれ単独または両者とも添加した無血清基本培地を用いてES細胞GSI-1からEBを形成させた。実施例7と同様にして、それぞれのEBから細胞浮遊液1.5mLを回収し、その0.4mLに、

(c) 50ng/mLマウスVEGFまたは(d) 50

ng/mLマウスVEGFと50ng/mLヒトSCGF(示した各因子の濃度は回収細胞浮遊液に加えて2mLになったときの濃度)を含む20%FCS添加IMDM培地1.6mLを加えて、実施例7と同様に培養した。ただし、培養には細胞培養用6穴プレート(代わりに、フィブロネクチンでコートした6穴プレート(Becton Dickinson社製、BIOCCAT Cellware)を用いた。生じたコロニーの細胞の染色を行い、コロニー数を数えた。その結果、図13に示すように、いずれのEBからも多数の2次分化コロニーが生じることがわかった。なお、各EBとも造血因子添加培地の場合と同様に、(c)と(d)の培地でコロニー数に差はなく、2次分化コロニーの形成時におけるSCGFの添加によるコロニー数の増加はみられなかった。さらに、上記の各培養条件で得られた2次分化コロニーから、実施例8(2)と同様にして3次分化コロニーを形成させたところ、図22に示すように、コロニーの数はさらに増加した。

【0165】得られた3次分化コロニーを構成する細胞の細胞膜表面形質を、LSABユニバーサルキット(Dako社製)を用いた免疫組織化学により同定した。細胞を4%パラホルムアルデヒド固定し、1次モノクローナル抗体としてラット抗CD31(PECAM-1)抗体(Caltag社製)あるいはマウス抗CD144(VE-カドヘリン)抗体(Santa Cruz社製)と反応させ、ビオチン標識2次抗体、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンと順次反応後、ニューフクシンで発色しマイヤーヘマトキシリンでカウンター染色した。陰性対照1次抗体としてそれぞれラットIgG2a(Zymed社製)およびマウスIgG1(Dako社製)を使用した。アルカリホスファターゼ発色基質にレバミゾールを加えることにより内因性アルカリホスファターゼをブロックした。なお詳細な反応条件はメーカー指定の方法に従った。その結果、血管内皮細胞に特異的な膜表面形質であるCD144(VE-カドヘリン)陽性細胞およびCD31(PECAM-1)陽性細胞を認めた。図23に、ヒトSCGFとヒトBMP-4添加無血清培養により形成されたEBから、マウスVEGFおよびヒトSCGFを添加した培養により得られた3次分化コロニーの構成細胞の免疫組織化学の結果を示す。

【0166】また、ヒトSCGF、ヒトBMP-4の各因子をそれぞれ単独または両者とも添加した無血清培養により形成させたEBから、マウスVEGFおよびヒトSCGFを添加した培養により得られた3次分化コロニーの構成細胞について、以下のようにして発現遺伝子の解析を行った。3次分化コロニーの構成細胞から、RNeasy(Qiagen社製)を使用して全RNAを調製した。続いてSUPERScript II(Invitrogen社製)によりcDNAを逆転写し、ポリメラーゼチェーン反応(polymerase chain reaction; PCR)により、血管内皮細胞に特異的な遺伝子の発現を検出した。PCRに用いたプライマーおよびそ



のPCR産物のサイズを表1に示す。

【0167】

表1

遺伝子	5'プライマー	3'プライマー	PCR産物(bp)
c-fik-1	配列番号6	配列番号7	269
c-flt-1	配列番号8	配列番号9	317
c-tie-1	配列番号10	配列番号11	228
CD31(PECAM-1)	配列番号12	配列番号13	260
CD34	配列番号14	配列番号15	354
CD144(VE-cadherin)	配列番号16	配列番号17	226
vβ	配列番号18	配列番号19	~500

【0168】PCRはTakara Taq(宝酒造社製)、GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer社製)を用いて行った。まず94℃で5分加熱後、各遺伝子について表2に示す条件を繰り返し、最後に72℃5分加熱し4℃で冷却した。PCR産物を4.5%ポリアクリルアミドゲル※

表2

遺伝子	変性	アニーリング	ポリメラーゼ 反応	サイクル数
c-fik-1	94℃, 1分	55℃, 1分	72℃, 1分	30
c-flt-1	94℃, 1分	55℃, 1分	72℃, 1分	30
c-tie-1	94℃, 1分	55℃, 1分	72℃, 1分	30
CD34	94℃, 1分	55℃, 1分	72℃, 1分	30
CD31 (PECAM-1)	94℃, 1分	55℃, 1分	72℃, 1分	30
CD144 (VE-cadherin)	94℃, 1分	61℃, 1分	72℃, 2分	40
vβ	94℃, 1分	61℃, 1分	72℃, 2分	40

【0170】その結果、図24に示すように、どの3次分化コロニーの構成細胞についても、血管内皮細胞に特徴的な遺伝子であるc-fik-1、c-flt-1、c-tie-1、c-tie-2、CD31(PECAM-1)、CD34、フォンウィルブランド因子およびCD144(VE-カドヘリン)の発現を認めた。

【0171】比較例1 従来法における無血清培養でのEBの形成

ジョハンソン(Johansson)らの報告(B. M. Johansson & M. V. Wiles; Mol. Cell. Biol., 15, 141, 1995)に従って、インスリン、トランスフェリン、アルブミンを含有する無血清培地を用いてES細胞GSI-1の培養を行った。

【0172】無血清培地は、IMDM培地(GIBCO/BRL社製)とF12培地(GIBCO/BRL社製)を等量混合した培地を基礎培地として用い、2mMグルタミン、5mg/mL牛血清アルブミン(Boehringer Mannheim社製)、15μg/mLトランスフェリン(Boehringer Mannheim社製)、450μMモノデオキシグリセロール、7μg/mLインスリン(GIBCO/BRL社製)および1倍濃

\*【表1】

\*

※で電気泳動の後、SYBR Green I(宝酒造社製)で染色し、Molecular Imager FX(Bio-Rad社製)で検出した。

【0169】

【表2】

度の脂質(100x mixture chemically defined lipid concentration; Life Technologies社製 カタログ番号066-01905H)を添加した培地と、さらに1U/mL LIF(ESGRO Murine LIF;ライフチェックオリエンタル株式会社製)を添加した培地を調製し実験に用いた。

【0173】ES細胞は、無血清培養開始の2日前に、コンフルエント濃度の10分の1になるように継代した細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、1mM EDTAおよび0.25%トリプシンを含むPBS(-)溶液を加え37℃で5分間インキュベーションを行うことで単一細胞状態にし、上述のいずれかの無血清培地に5,000細胞/mLの細胞濃度に懸濁したものを調製して実験に用いた。

【0174】ES細胞の無血清培養は以下のように行った。5,000細胞/mLの細胞濃度に調製したES細胞を、市販の細菌培養用35mmデッシュ(岩城硝子株式会社製)に1mLずつ播種後、37℃5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養を行い、形成されたEBの形態を倒立顕微鏡下で観察した。

【0175】LIFを添加していない培地を用いて培養

した場合には、3日後には細胞が死滅し、ジョンソン (Johansson) らの報告の結果を再現した。また、LIFを添加した場合でも細胞の長期間に渡る維持は難しく、1週間以上の培養ではEBの形成がほとんど観察されなかった。

#### 【0176】参考例1 SCGFの調製

##### 1) 発現ベクターの作製

動物細胞用発現ベクターpAGE210 (W095/34016) のHindIII/KpnI処理断片をマウスSCGFポリペプチドをコードするDNA (W098/08869) と連結したマウスSCGF発現ベクターpAGE-mSCGFの構築を以下に行った(図7参照)。

【0177】3  $\mu$ gのpBluescript II SK+ (STRATAGENE社製) を制限酵素HindIIIとKpnIで消化し、BAP (宝酒造株式会社製) 処理した後、フェノールクロロホルム処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿し、最終的に水に溶解した。配列番号1記載のマウスSCGF cDNAのうち、配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードする部分をPCR法を利用して調製した。正方向プライマーとしては配列番号3に記載のオリゴヌクレオチドを、逆方向プライマーとして配列番号4に記載のオリゴヌクレオチドを使用した。合成オリゴヌクレオチドは固相法を原理とする全自動DNA合成機を使用して作製した。各オリゴヌクレオチドの精製は、OPCカートリッジを使用して行った。クローン21-1C4-5H5 (PCT国際公開W098/08869) 約100 ngを鋳型として、50  $\mu$ L反応液中でNative Pfu Polymerase (1.25単位; STRATAGENE社製) によるPCRを実施した。PCRは、10% DMSO存在下、それぞれ正方向プライマー、逆方向プライマー50  $\mu$ Mを使用し、PCR工程(1サイクルは変性94°C; 1分間、アニーリング50°C; 1分間、ポリメラーゼ反応72°C; 4分間からなる)を20サイクル行い、最後に72°Cで7分間反応させた。得られたPCR産物をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、制限酵素HindIIIとKpnIで消化した。該反応液をアガロースゲル電気泳動により分画し、ゲルから1,000 bp付近のDNA断片を切り出し、精製し、TE緩衝液に溶出した。該PCR増幅物のHindIII/KpnI処理断片とpBluescript II SK+のHindIII/KpnI処理断片とを連結し、大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (CLONTech社製) を形質転換し、図7に示すpB-mSCGFを得た。得られたクローンが正確なマウスSCGF cDNAの配列を有することは自動DNAシーケンサー (ABI社製373) によって確認した。

【0178】3  $\mu$ gのpAGE210を制限酵素HindIIIとKpnIで消化し、BAP (宝酒造株式会社製) 処理した後、フェノールクロロホルム処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿し、最終的に水に溶解した。pB-mSCGFを制限酵素HindIIIとKpnIで消化し、アガロースゲル電気泳動により分画し、ゲルから1,000 bp付近のDNA断片を切り出し、精製し、TE緩衝液に溶出した。該断片と

pAGE210のHindIII/KpnI処理断片とを連結し、大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (CLONTech社製) を形質転換し、図7に示すpAGE-mSCGFを得た。

【0179】なお、図7中のpSEはシミアン・ウィルス (simian virus) 40 (SV40) 初期遺伝子プロモータを示し、Hvgはハイグロマイシン耐性遺伝子を示し、dhfrはジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を示し、P1はpBR322由来P1プロモータを示し、Ptkはヘルペス・シンプレックス・ウィルス (Herpes simplex virus; HSV) チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子のプロモータを示し、ABGはラビット  $\beta$  グロブリン遺伝子ポリA付加シグナルを示し、ASEはシミアン・ウィルス (simian virus) 40 (SV40) 初期遺伝子ポリA付加シグナルを示す。

##### 【0180】2) 動物細胞におけるマウスSCGFポリペプチドの発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、宮地らの方法に従い、エレクトロポレーション法 (Miyaji et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) を用いて行った。上記で得られたpAGE-mSCGFを、dhfr遺伝子を欠損したCHO細胞 (Urtaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. US A., 77, 4216-4220, 1980) 4  $\times$  10<sup>6</sup>個あたり4  $\mu$ g導入後、10 mLのMEM $\alpha$  (核酸含有: Life Technologies社製) - 5%血清 (Life Technologies社製) 培地に懸濁し、96-well plate (岩城硝子社製) にまいた。37°Cの5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中で24時間培養した後、ハイグロマイシン (Life Technologies社製) を0.3 mg/mLとなるように添加し、1-2週間培養し耐性株を得た。これら耐性株を24-well plateに継代培養し、メトトレキセート (MTX) を50 ng/mL含むMEM $\alpha$  (核酸非含有: Life Technologies社製) - 5%透析血清 (Life Technologies社製) 培地に培養した。MTX耐性を獲得した細胞株のうち、抗SCGF抗体を用いたウェスタンブロッティング (PCT国際公開W098/08869) によりマウスSCGFを多く生産していることが確認された細胞を拡大培養し、EXCELL361 (JRH社製) に培地を交換して4日から10日間培養した。細胞を遠心操作によって除去し、マウスSCGFポリペプチドを含む培養上清サンプルを得た。

##### 【0181】3) CHO細胞培養上清からのマウスSCGFの精製

得られたCHO細胞培養上清400 mLは、セルロースアセテートろ過膜 (ミニザルトプラス、ザルトリウス社製) でろ過した後、亜鉛イオン固定化キレートセファロースFast Flow担体 (ファルマシア社製) を充填したカラム (15 mm  $\times$  100 mm) に負荷した。0.5 M塩化ナトリウム含有20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) でカラムを十分洗浄後、0~100 mMヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。各溶出分画についてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、銀染色 (2D-銀染色試

葉-II[第一]、第一化学薬品社製)で検出される約47 kDaのバンドを多く含む約4.5 mM~7.0 mMヒスチジン溶出分画を回収した。

【0182】このヒスチジン溶出分画30 mLに終濃度が6.5%となるように12.9 gの硫酸アンモニウムを添加し、攪拌溶解した。4℃下で2時間放置した後、18800Gで30分間遠心して得た沈殿物に9 mLの10 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)を添加し、攪拌溶解した。

【0183】溶解液は10 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したMono Q陰イオン交換クロマトグラフィーカラム(5 mm×50 mm, ファルマシア社製)に負荷した。平衡化液で十分洗浄後、0~1.0 M塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。各溶出分画についてSDS-PAGEを行い、銀染色で検出される約47 kDaのバンドを多く含む約3.5 mM~5.0 mM塩化ナトリウム溶出分画を回収した。

【0184】ここで得た溶出分画3 mLは瓶外ろ過膜(マイクロコン10、ミリポア社製)で濃縮した後、PBS(pH7.4)で平衡化したSuperose 6ゲル過クロマトグラフィーカラム(10 mm×300 mm, ファルマシア社製)に負荷した。各溶出分画についてSDS-PAGEを行い、銀染色で検出される約47 kDaのバンドを多く含む溶出体積Veが11.5 mL~13.5 mLの分画を回収した。この最終分画は2-メルカプトエタノール存在下でSDS-PAGEを行ったところ、クマジーブルー染色で約47 kDaの単一バンドを示した(図8)。

【0185】精製マウスSCGFのN末端アミノ酸配列はタンパク質化学の常法に従って決定した。精製分画を2-メルカプトエタノール還元下でSDS-PAGEを行った後、P. Matsudairaの方法(J. Biol. Chem., 262, 10035-10038, 1987)に従いPVDF膜(ProBlott, アブライドバイオシステムズ社)へ電気的に転写した。転写した膜をクマジーブルー染色して得られた約47 kDa付近のバンドを切り出し、気相プロテインシーケンサー(PPSQ-10, 島津製作所社製)を用いてメーカ推奨の方法によりN末端アミノ酸配列を解析した。得られたアミノ酸配列を配列番号5に記載したが、マウスSCGF遺伝子配列から推定される開始メチオニン残基から22残基目のアラニン残基からの配列に一致した。

【0186】参考例2 ヒトSCGFの調製

(1) ヒトSCGF発現用プラスミドpAGE-SCGFαの構築および動物細胞での発現

動物細胞用発現ベクターpAGE21G(WC95/34016)の**hndII**/**KpnI**処理断片とヒトSCGFをコードするDNA(Mito; Biochem. Biophys. Res. Commun., 249, 124, 1998)とを連結することにより、ヒトSCGF発現ベクターpAGE-SCGFαを構築した。

【0187】動物細胞へのプラスミドの導入は直接等の方法(Cytotechnology, 3, 133, 1990)に従いエレクトロポレーション法により行った。4 μgのpAGE-SCGFαを4×10<sup>6</sup>個のdhfr遺伝子欠損CHO細胞株(Ur1a<sup>+</sup> and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)へ導入した。この細胞を10 mLのMEMα200G-dFCS(5)培地(透析FCSを5%, 7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200 mLグルタミン溶液(GIBCO/BRL社製)を3%, ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO/BRL社製, 5000単位/mLペニシリンおよび5000 mg/mLストレプトマイシン含有)を0.5%含むMEMα200G培地(GIBCO/BRL社製)に懸濁し、10 cmプレート(IWAKI社製)に入れ、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養した。ハイグロマイシン(GIBCO/BRL社製)を終濃度0.3 mg/mLになるよう添加し、さらに1~2週間培養した。形質転換細胞がコンフルエントになった時点で回収し、ハイグロマイシンを0.3 mg/mL、メトトレキサート(methotrexate; MTX)を50 nmol/L含むMEMα200G-dFCS(5)培地に1~2×10<sup>6</sup>細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2 mL分注した。1~2週間の培養後、50 nmol/L MTX耐性の細胞を0.3 mg/mLハイグロマイシン、200 nmol/L MTX含有MEMα200G-dFCS(5)培地に1~2×10<sup>6</sup>細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2 mL分注した。1~2週間の培養後、200 nmol/L MTX耐性の細胞を得た。この200 nmol/L MTX耐性細胞を10 mg/Lのアプロチニン(aprotinin; Sigma社製)を含む無血清EX-CELL 301培地(JRH Biosciences社製)を用い、2 Lのローラーボトル(Greiner社製)で37℃、80回転/分で培養を行った。約5日間の培養後、細胞を遠心操作により分離し、培養上清サンプルを得た。

【0188】(2) KM2142を用いたウェスタンブロットニングによるヒトSCGFの存在確認  
抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142(WC98/08859に記載の方法により作製した)を用いたウェスタンブロットニングにより、ヒトSCGFの存在の有無について、以下の方法により実施した。以下の(3)で記述するヒトSCGFのクロマトグラフィー精製における各精製分画をSDS-PAGEで分離後、P. Matsudairaの方法(J. Biol. Chem., 262, 10035, 1987)に従ってPVDF膜(Immobilon Transfer Membrane, ミリポア社製)へ電気的に転写した。転写膜はブロッキング溶液(1%ウシ血清アルブミンを含むPBS(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 9.6 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2))中で30分間振盪した後、ブロッキング溶液で1 mg/mLに希釈したKM2142を含む溶液中で室温60分間振盪し

た。該転写膜はさらに0.05% Tween 20を含むPBSで5分間洗浄を2回、PBSでの5分間洗浄を1回実施した後、パーオキシダーゼで標識された抗ラットIgG抗体(DAKO社製)をPBSで1/1000に希釈した溶液中で室温60分間振盪した。0.05% Tween 20を含むPBSで5分間洗浄を2回、PBSでの5分間洗浄を1回実施した後、発光法(ECL Western blotting detection reagents, アマシヤム ファルマシア バイオテク社製)により検出した。

【0189】(3) CHO細胞培養上清からのヒトSCGFの精製

(1)で得られたCHO細胞培養上清から、ヒトSCGFを以下の3段階のクロマトグラフィーにより精製取得した。

第1段階: 亜鉛キレートクロマトグラフィー

Zn<sup>2+</sup>イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体(アマシヤム・ファルマシア・バイオテク社製)を径5.0cm×20cmのカラム(BioRad社)に14.5cmの高さまで充填し、0.5mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化した。これに上記(1)で得たCHO細胞培養上清12Lを添加し、同平衡化液で十分に洗浄後、0~100mmol/Lヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

【0190】第2段階: MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度50%となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4℃で2時間放置した。18800×gで30分間遠心して得られた沈澱を10mmol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、同トリス-塩酸緩衝液\*

\*で平衡化したMonoQ HR 10/10 カラム(アマシヤム ファルマシア バイオテク社)に添加した。平衡化液で十分洗浄後、0~1mol/L塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

【0191】第3段階: S-400ゲルろ過クロマトグラフィー

15 Sephacryl S-400 HR担体(アマシヤム ファルマシア バイオテク社)をXK50/50カラム(アマシヤム ファルマシア バイオテク社)に51.5cmの高さまで充填したカラムとXK50/100カラム(アマシヤム ファルマシア バイオテク社)に93cmの高さまで充填したカラムを直列に連結し、PBSで十分平衡化した。これに上記MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー精製画分28mLを添加し、6mL/分の流速でPBSにより溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。この最終精製品のSDS-PAGEにおけるパターン(クマジーブルー染色)を図25に示す。

【0192】

【発明の効果】本発明により、血清培養、無血清培養いずれの培養条件においても、胚性幹細胞からEBを効率的に形成させることができる。

【0193】

【配列表のフリーテキスト】配列番号3-人工配列の説明: マウスSCGF cDNAコード領域の増幅とその5'末端へのHindIII認識部位作成のための正方向プライマー配列番号4-人工配列の説明: マウスSCGF cDNAコード領域の増幅とその3'末端へのKpnI認識部位作成のための逆方向プライマー

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

- <110> KYOKA HAKKO KOGYO CO., LTD.
- <120> PROCESS OF FORMING AN EMBRYOID BODY AND USE THEREOF
- <130> P-35214-1
- <150> JP 2001-110100
- <151> 2001-04-09
- <160> 19
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1399
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <220>
- <221> CDS
- <222> (132)..(1118)

&lt;400&gt; 1

gaagcttcca gaagaaagtc aaqaggtttg tgaactcccc accagacttg gacacttqct 60  
 aagctctatc aagagctcta cccctggcat tctgacctct ctactatttg gttgctggga 120  
 aagccagctg g atg caq qca qcc ttg ctc ttg ggg qcc cta qtg qtc cct 170

Met Gln Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Leu Val Val Pro

1

5

10

caq ctt ttg agt ttt ggt cat qga qcc cga ggt cct ggg aag gaa tgg 218  
 Gln Leu Leu Ser Phe Gly His Gly Ala Arg Gly Pro Gly Arg Glu Trp

15

20

25

gaq qga qcc ttg qga ggt qcc ctg gaa gaa gaa aag gaa cga gaa tca 256  
 Glu Gly Gly Trp Gly Gly Ala Leu Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ser

30

35

40

45

caq atg ttg aag aat ctc caq gaa qcc cta ggg ctg ccc act ggg tgg 314  
 Gln Met Leu Lys Asn Leu Gln Glu Ala Leu Gly Leu Pro Thr Gly Val

50

55

60

gaa aat gaa gat aat ctt gct gaa aac cct gaa qac aaa gaa qtc tgg 362  
 Gly Asn Glu Asp Asn Leu Ala Glu Asn Pro Glu Asp Lys Glu Val Trp

65

70

75

gaq acc aca gaa act caa ggg gaa gaa gaa gaa gaa gaa atc acc aca 410  
 Glu Thr Thr Glu Thr Gln Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ile Thr Thr

80

85

90

gca cct tct tct aqt ccc aac cct ttc ccc aqt cct tct ccc aca cca 458  
 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Asn Pro Phe Pro Ser Pro Ser Pro Thr Pro

95

100

105

gaq qac act qtc act tac atc ttg qgc cgc ttg qcc aqc ctc ggt qca 506  
 Glu Asp Thr Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Ser Leu Asp Ala

110

115

120

125

gac cta cac caa ttg cac qtc cgt ctg cac gct ttg qac acc cgt qtc 554  
 Gly Leu His Gln Leu His Val Arg Leu His Val Leu Asp Thr Arg Val

130

135

140

gct gaa ctg acc caq ggg ctg cgg caq ctg cgg gac gct qcg aqt gac 602  
 Val Glu Leu Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asp Ala Ala Ser Asp

145

150

155

acc cgc qac tca qtg caa qcc ctg aag gaa qcc caq qac cgt gct gaa 650  
 Thr Arg Asp Ser Val Gln Ala Leu Lys Glu Val Gln Asp Arg Ala Glu

160

165

170

caq gaa cac qgc cgc ttg gaa qgc tgc ctg aag qac ctg cgc ctt qac 698  
 Gln Glu His Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu Arg Leu Gly

175

180

185

cac aag tgc ttc ctg ctc ttg cga qac ttc gaa acc caq qcg qcg qcg 746  
 His Lys Cys Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Thr Gln Ala Ala Ala

190

195

200

205

caq cgc cgg tgc aag qcg cga ggt ggg aqc tta qca caq cct qcg qac 794  
 Gln Ala Arg Cys Lys Ala Arg Gly Gly Ser Leu Ala Gln Pro Ala Asp

210

215

220

cgc caq caa atg gac qcg cta aqc cgg tac tta cgc qcc gct ctc qcc 842  
 Arg Gln Gln Met Asp Ala Leu Ser Arg Tyr Leu Arg Ala Ala Leu Ala

225

230

235

ccc tac aat tgg cgg ggc ttg ctg gaa qtg cac gac cgg cgc tcc gaa 890

67

68

Pro Tyr Asn Trp Pro Val Trp Leu Gly Val His Asp Arg Arg Ser Glu  
 240 245 250  
 gaa ctc tac ctt ttc gaa aac ggc caq cgc gcg tct ttc ttc gcc tgg 938  
 Gly Leu Tyr Leu Phe Glu Asn Gly Gln Arg Val Ser Phe Phe Ala Trp  
 255 260 265  
 cac cgc gca ttc aac ctg gaa tcc ggc gcc caq cct aat gcg gca aca 986  
 His Arg Ala Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ala Gln Pro Ser Ala Ala Thr  
 270 275 280 285  
 cat cca ctc agc ccg gat caq ccc aat ggc ggc gcc ctg gaa aac tgc 1034  
 His Pro Leu Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly Val Leu Glu Asn Cys  
 290 295 300  
 gcg gcc caq gcc tca gac gac ggc tct tgg tgg gac cat gac tat gaa 1082  
 Val Ala Gln Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp Asp His Asp Cys Glu  
 305 310 315  
 cgg cgc ctc tac ttc gcc tgc gaa ttc ccc ttc taq aqaaccggtc 1128  
 Arg Arg Leu Tyr Phe Val Cys Glu Phe Pro Phe  
 320 325  
 tctgcccaag aactcagtg cacattctac accgtacacc ggcacccta tcttagagg 1188  
 cctggaagtc gctcagagat taagctgac catgaataca tcttaattcag aagaagcttt 1248  
 tctattaga tactggacc caactgatt gggccaggt gtgtcttga gattgcttc 1308  
 aagatgatt atcagccag qgattttaa gcaaacccc acaagatttc atcagctc 1368  
 ctacatga ggcgagca taaaaatta a 1399

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 328

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Gln Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Leu Val Val Pro Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Phe Gly His Gly Ala Arg Gly Pro Gly Arg Glu Trp Glu Gly Gly  
 20 25 30  
 Trp Gly Gly Ala Leu Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ser Gln Met Leu  
 35 40 45  
 Lys Asn Leu Gln Glu Ala Leu Gly Leu Pro Thr Gly Val Gly Asn Glu  
 50 55 60  
 Asp Asn Leu Ala Glu Asn Pro Glu Asp Lys Glu Val Trp Glu Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Gln Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ile Thr Thr Ala Pro Ser  
 85 90 95  
 Ser Ser Pro Asn Pro Phe Pro Ser Pro Ser Pro Thr Pro Glu Asp Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Ser Leu Asp Ala Gly Leu His  
 115 120 125  
 Gln Leu His Val Arg Leu His Val Leu Asp Thr Arg Val Val Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asp Ala Ala Ser Asp Thr Arg Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Val Gln Ala Leu Lys Glu Val Gln Asp Arg Ala Glu Gln Glu His  
 165 170 175

69

70

Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu Arg Leu Gly His Lys Cys  
 180 185 190  
 Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Thr Gln Ala Ala Ala Gln Ala Arg  
 195 200 205  
 Cys Lys Ala Arg Gly Gly Ser Leu Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gln Gln  
 210 215 220  
 Met Asp Ala Leu Ser Arg Tyr Leu Arg Ala Ala Leu Ala Pro Tyr Asn  
 225 230 235 240  
 Trp Pro Val Trp Leu Gly Val His Asp Arg Arg Ser Glu Gly Leu Tyr  
 245 250 255  
 Leu Phe Glu Asn Gly Gln Arg Val Ser Phe Phe Ala Trp His Arg Ala  
 260 265 270  
 Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ala Gln Pro Ser Ala Ala Thr His Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly Val Leu Glu Asn Cys Val Ala Gln  
 290 295 300  
 Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp Asp His Asp Cys Glu Arg Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Tyr Phe Val Cys Glu Phe Pro Phe  
 325

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> forward primer for amplification of a coding region of mouse SCGF  
 cDNA and creation of a HindIII site at its 5' end

&lt;400&gt; 3

ccccaagcct ccaccatgca ggcagcctgg cttctgg

37

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> reverse primer for amplification of a coding region of mouse SCGF  
 cDNA and creation of a KpnI site at its 3' end

&lt;400&gt; 4

gggtaccctt actagaaggg gaactcgaq acg

33

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (8)

&lt;400&gt; 5

Ala Arg Gly Pro Gly Arg Glu Xaa Glu Gly Gly  
 1 5 10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

tcttgtgttc tgcctgaga

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7

gacacattc caaccacct

20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

ctctgacgt gacgacg

18

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 9

catgaccta gccacctg

18

40

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

ctcactccc tctgacg

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 20



73

74

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 11

cgaatgactt ggaatagaac

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 12

gacatgcca aggtcagta

20

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 13

cctctcaga cctctcaga

20

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 14

cctctctga gacccctca

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 15

cgaaggtga ccaatgcaat

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 16

ggaatcaga gctcacaga

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 17

cgaaggttc acgtcgaat

20

<210> 18  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 18  
 atqatqatqat qattacacat cttccag

27

10

<210> 19  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 19  
 ccaqctcacc caccctactg aqcaq

25

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】は、細胞外マトリックス蛋白質をコートしたプレート上で胚性幹細胞を無血清培養した場合に形成されるEBのコロニー数を示したグラフである。各カラム番号は、図下部に示した各種蛋白性因子を含む無血清基本培地を用いたことを示している。尚、CM'はSCF、FL、IL-3、TPOの4因子が含まれることを意味している。

【図2】は、フィブロネクチンをコートしたプレート上でES細胞を無血清培養した場合に形成されるEBの出現の様子を示した写真である。各ウェルの左肩の番号は、図下部に示した各種蛋白性因子を含む無血清基本培地を用いたことを示している。尚、CM'はSCF、FL、IL-3、TPOの4因子が含まれることを意味している。

【図3】は、フィブロネクチンをコートしたプレート上でES細胞を無血清培養した場合に形成されるEBの顕微鏡像の写真である。写真の左側に記した蛋白性因子を含む無血清基本培地を用いた。尚、CM'はSCF、FL、IL-3、TPOの4因子を意味している。

【図4】は、フィブロネクチンをコートしたプレート上でES細胞を無血清培養した場合に形成されるEBの出現の様子を示した写真である。各ウェルの左肩の番号は、図下部に示した各種蛋白性因子を含む無血清基本培地を用いたことを示している。7番、17番、18番、27番のプレートで1個、19番、28番、30番のプレートで2個、29番のプレートで3個のEBの出現が観察された。その他のプレートではEBの形成は観察されなかった。

【図5】は、フィブロネクチンをコートしたプレート上でES細胞を無血清培養した場合に形成されるEBのコロニーの数が、縮植するES細胞の細胞密度を変えた場合にどのように変化したか示したグラフである。●はSCGFとSCFを含む無血清基本培地を用いた場合の結

果を、○は無血清基本培地のみを用いた場合の結果を示している。

【図6】は、ES細胞を血清培養した場合に形成されるEBのコロニーの数の変化を経時的に示したグラフである。○は血清培地を用いた場合、●はSCGFを含む血清培地を用いた場合、▲はSCF、FL、IL-3およびTPOを含む血清培地を用いた場合、■はSCGF、SCF、FL、IL-3およびTPOを含む血清培地を用いた場合に形成されたEBの数を示している。

【図7】は、動物細胞でのマウスSCGF発現用ベクターの構築過程を示した図である。

【図8】は、CHO細胞で発現したマウスSCGFを精製しSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った図である（レーン1：分子重量マーカー、レーン2：精製マウスSCGF）。

【図9】は、EBから回収した細胞を造血因子添加培地で培養し、生じた2次分化コロニーをメイ-グリュンバルト-ギムザ染色した写真である。各ウェルの培養に用いたEBは、ES細胞を、各ウェルの外に記載した因子をそれぞれ添加した無血清培地で培養することにより形成されたものである。

【図10】は、横軸に示す因子をそれぞれ添加した無血清培地で、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞を培養することにより形成されたEB、およびそのEBから回収した細胞を造血因子添加培地で培養することにより生じた2次分化コロニーの数を示すグラフである。白い棒グラフはEBの数、黒い棒グラフは2次分化コロニーの数を示す。

【図11】は、EBから回収した細胞を造血因子非添加のFCS添加IMDM培地で培養し、生じた2次分化コロニーをメイ-グリュンバルト-ギムザ染色した写真である。各ウェルの培養に用いたEBは、ES細胞を、各ウェルの下に記載した因子をそれぞれ添加した無血清培地で培養することにより形成されたものである。

【図12】の1～6は全て、ES細胞のヒトSCGF添加無血清培地により形成されたEBから回収した細胞を、造血因子添加培地で培養し、生じた2次分化コロニーを構成する細胞について、メイ・グリュンバルト・ギムザ染色したサイトスピン標本の顕微鏡写真の例である。

【図13】は、ES細胞の無血清培地で形成されたEB、およびそのEBから回収した細胞の培養により生じた2次分化コロニーの数を示すグラフである。横軸にES細胞の無血清培養（1次培養）、EBの細胞の培養（2次培養）において、それぞれ添加した因子の組み合わせ（+は添加、-は非添加）を示す。白いバーはEBの数、黒いバーは2次分化コロニーの数を示す。

【図14】は、ヒトSCGFおよびヒトBMP-4添加無血清培地により形成されたEBから回収した細胞を造血因子添加培地で培養することにより得られた2次分化コロニーの構成細胞について、シングルカラーフローサイトメトリーによる膜表面形質の解析結果を示す図である。左の図は、2次分化コロニーの各構成細胞の前方および側方散乱光の分布を示し、枠内で囲まれた細胞群について、シングルカラーフローサイトメトリーによる解析を行った。右の図は、上からFITC標識抗Scd-1抗体、R-PE標識抗CD34抗体、R-PE標識抗CD117抗体をそれぞれ用いたシングルカラーフローサイトメトリーの解析結果であり、それぞれの図の右側のグラフが、各抗体を用いた解析、左側のグラフが陰性対照を示す。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。M2は陰性対照の蛍光強度の範囲を示し、M1は陽性細胞とした蛍光強度の範囲を示す。

【図15】は、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞の無血清培地により形成されたEBから回収した細胞の培養により得られた2次分化コロニーにおける、横軸に示した各細胞膜表面形質の陽性細胞数を示すグラフである。グラフの下に、各バーにおける、ES細胞の無血清培養（1次培養）、EBの細胞の培養（2次培養）において、それぞれ添加した因子の組み合わせを示す。

【図16】は、横軸に示す因子をそれぞれ添加した無血清培地で、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞を培養することにより形成されたEB、そのEBから回収した細胞を造血因子添加培地で培養することにより生じた2次分化コロニー、および2次分化コロニーから回収した細胞を造血因子添加培地で培養することにより生じた3次分化コロニーの数を示すグラフである。白いバーはEBの数、灰色のバーは2次分化コロニーの数、黒いバーは3次分化コロニーの数を示す。

【図17】は、各パネルの左上に示した因子を添加した無血清培地でES細胞を培養することにより形成されたEBから、造血因子添加培地を用いた培養により得られた3次分化コロニーについて、構成細胞のメイ・グリュンバルト・ギムザ染色したサイトスピン標本の顕微鏡写

真である。

【図18】は、ヒトSCGF添加無血清培地から形成されたEBから回収した細胞の造血因子添加培地による培養で得られた3次分化コロニー構成細胞についてのシングルカラーフローサイトメトリーである。左上がFITC標識抗Scd-1抗体、右上がR-PE標識抗CD34抗体、左下がR-PE標識抗CD117抗体をそれぞれ用いたシングルカラーフローサイトメトリーであり、それぞれの図の薄い灰色のグラフが、各抗体を用いた解析、濃い灰色のグラフが陰性対照の抗体を用いた解析を示す。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。M2は陰性対照の蛍光強度の範囲を示し、M1は陽性細胞とした蛍光強度の範囲を示す。

【図19】は、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞の無血清培地により形成されたEBから回収した細胞の培養により得られた3次分化コロニーにおける、横軸に示した各細胞膜表面形質の陽性細胞数を示すグラフである。グラフの下に、各バーにおける、ES細胞の無血清培養（1次培養）、EBの細胞の培養（2次培養）において、それぞれ添加した因子の組み合わせを示す。

【図20】は、横軸に示す因子をそれぞれ添加した無血清培地で、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞を培養することにより形成されたEB、そのEBから回収した細胞をIL-7培地で培養することにより生じた2次分化コロニー、および2次分化コロニーから回収した細胞をIL-7添加培地で培養することにより生じた3次分化コロニーの数を示すグラフである。白いバーはEBの数、灰色のバーは2次分化コロニーの数、黒いバーは3次分化コロニーの数を示す。

【図21】は、ヒトSCGF添加無血清培地により形成されたEBから回収した細胞のIL-7添加培地による培養で得られた3次分化コロニー構成細胞について、FITC標識抗B220抗体を用いたシングルカラーフローサイトメトリーである。図の薄い灰色のグラフが抗B220抗体を用いた解析、濃い灰色のグラフが陰性対照の抗体を用いた解析を示す。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。M2は陰性対照の蛍光強度の範囲を示し、M1は陽性細胞とした蛍光強度の範囲を示す。

【図22】は、横軸に示す因子をそれぞれ添加した無血清培地で、 $3.5 \times 10^4$ 個のES細胞を培養することにより形成されたEB、そのEBから回収した細胞をVEGF添加培地で培養することにより生じた2次分化コロニー、および2次分化コロニーから回収した細胞をVEGF添加培地で培養することにより生じた3次分化コロニーの数を示すグラフである。白いバーはEBの数、灰色のバーは2次分化コロニーの数、黒いバーは3次分化コロニーの数を示す。

【図23】は、ヒトSCGFおよびBMP-4添加無血清培地により形成されたEBから回収した細胞を、VEGFおよびSCGF添加培地で培養することにより得られ

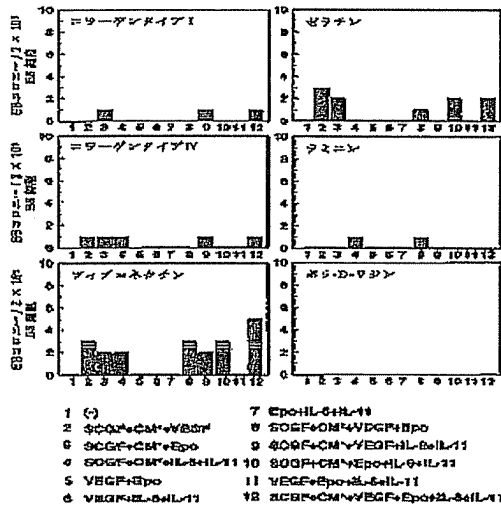
た3次分化コロニーの構成細胞についての、血管内皮細胞特異的な膜表面形質の免疫組織化学解析を示す図である。1次抗体として上から、陰性ラット対照IgGアイソタイプ（上パネル）、抗CD144（VE-カドヘリン）抗体（中パネル）および抗CD31（PECAM-1）抗体（下パネル）と反応させた結果を示す。

【図24】は、ES細胞の無血清培養により形成されたEBから回収した細胞を、VEGFおよびSCGF添加培地で培養することにより得られた3次分化コロニーの構成細胞についての、PCRによる血管内皮細胞特異的

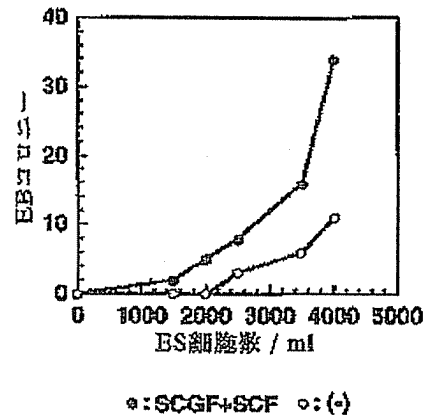
\* 遺伝子の発現解析を示す図である。上にそれぞれ解析した血管内皮細胞特異的遺伝子を、かっこ内にPCR産物のヌクレオチドサイズを示す。各レーンはES細胞の無血清培養を因子無添加（レーン1）、SCGF添加（レーン2）、BMP-4添加（レーン3）、SCGFおよびBMP-4添加（レーン4）で行った場合を示す。

【図25】は、CHO細胞の培養上清から精製したヒトSCGFのSDS-PAGEを示す図である。レーン1は分子重量マーカー、レーン2はヒトSCGFの最終精製品のSDS-PAGEを示す。

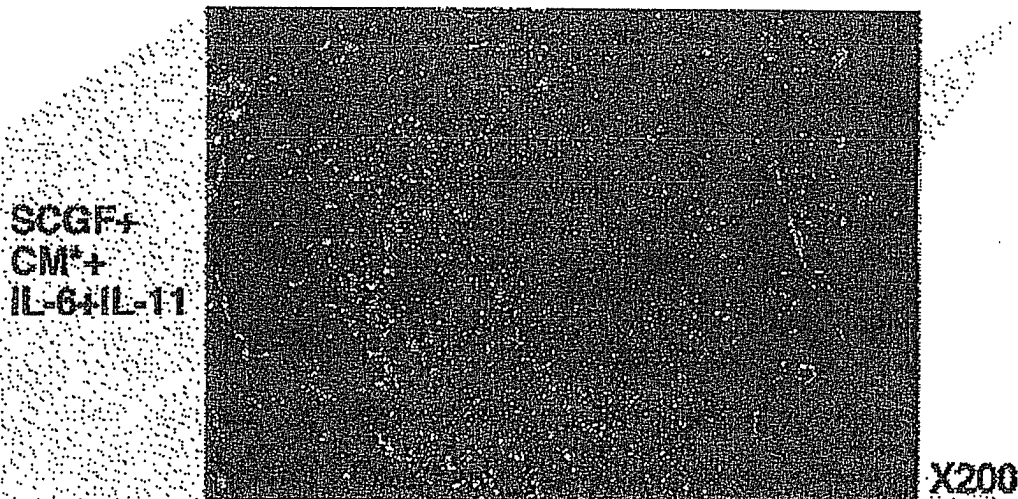
【図1】



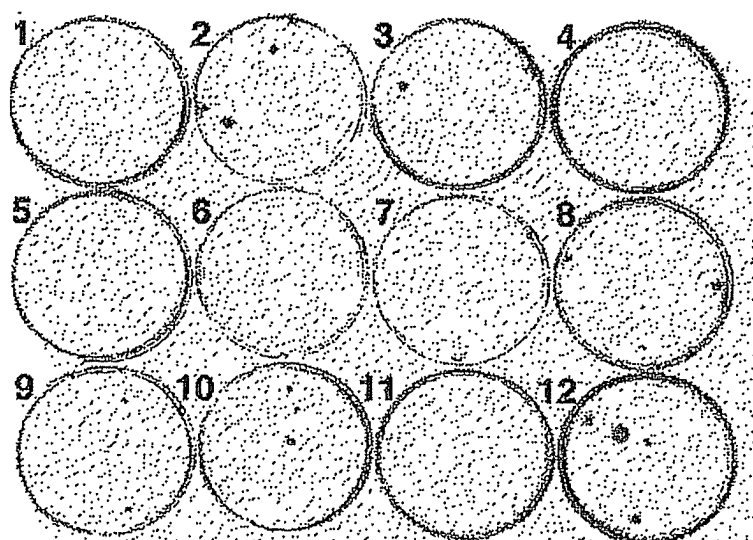
【図5】



【図3】

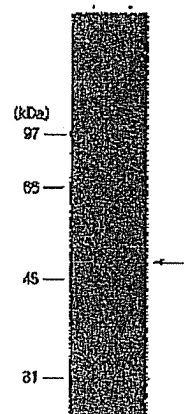


【図2】

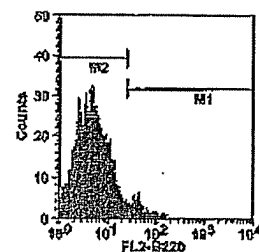


- |                       |                                 |
|-----------------------|---------------------------------|
| 1. (-)                | 7. Epo+IL-6+IL-11               |
| 2. SCGF+CM+VEGF       | 8. SCGF+CM+VEGF+Epo             |
| 3. SCGF+CM+Epo        | 9. SCGF+CM+VEGF+IL-6+IL-11      |
| 4. SCGF+CM+IL-6+IL-11 | 10. SCGF+CM+Epo+IL-6+IL-11      |
| 5. VEGF+Epo           | 11. VEGF+Epo+IL-6+IL-11         |
| 6. VEGF+IL-6+IL-11    | 12. SCGF+CM+VEGF+Epo+IL-6+IL-11 |

【図8】

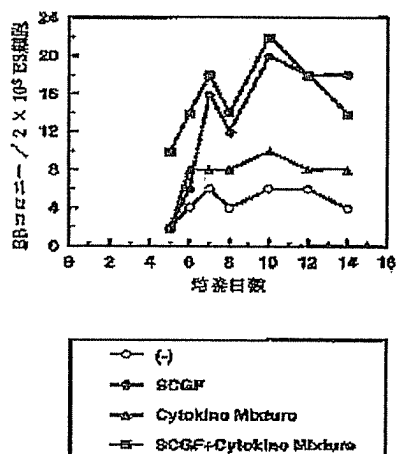


【図21】

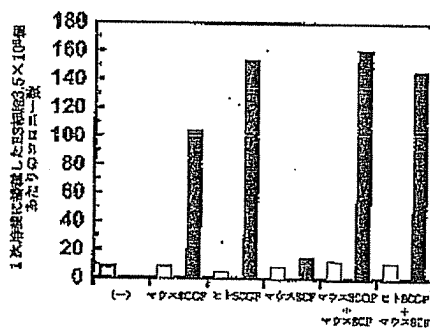


【図25】

【図6】



【図10】



1 2

(kDa)

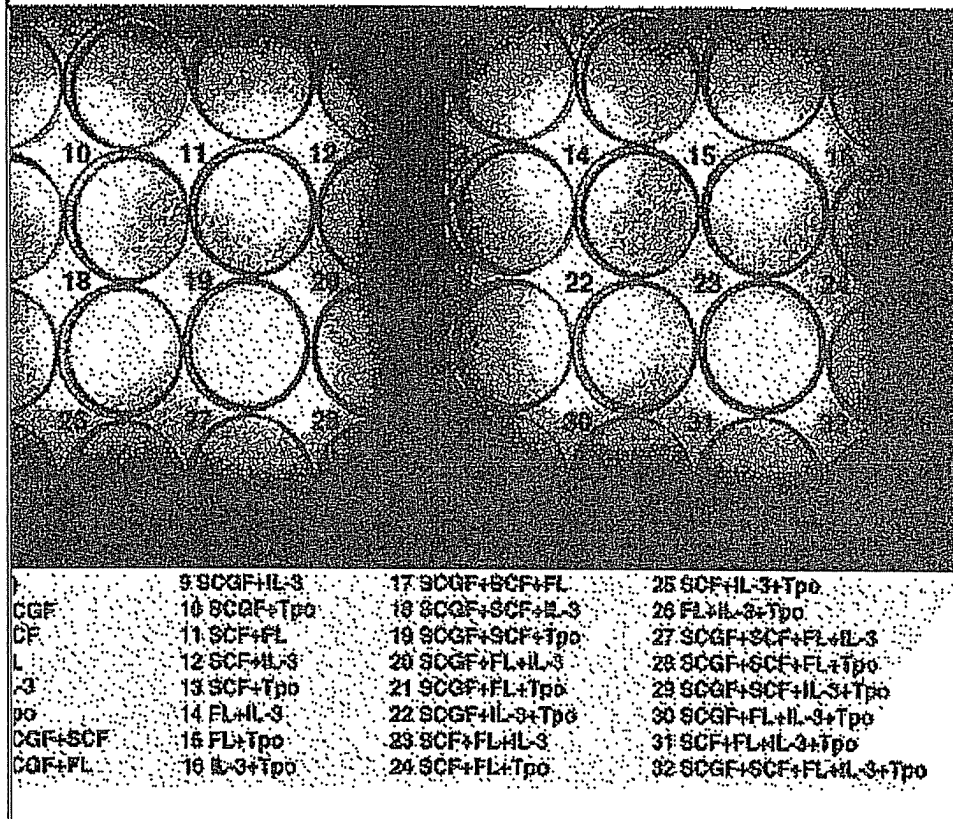
97-

66-

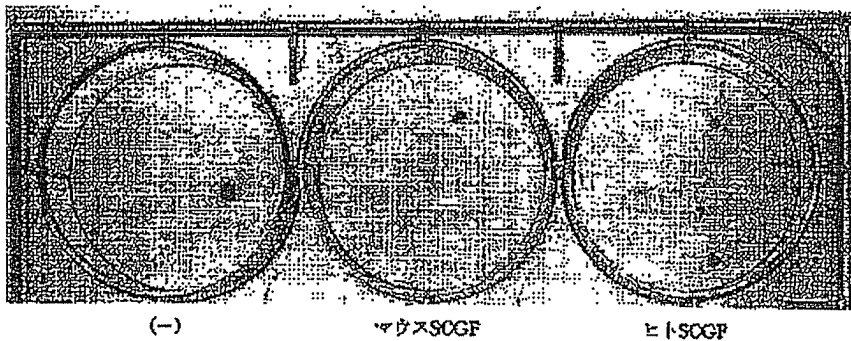
45-

31-

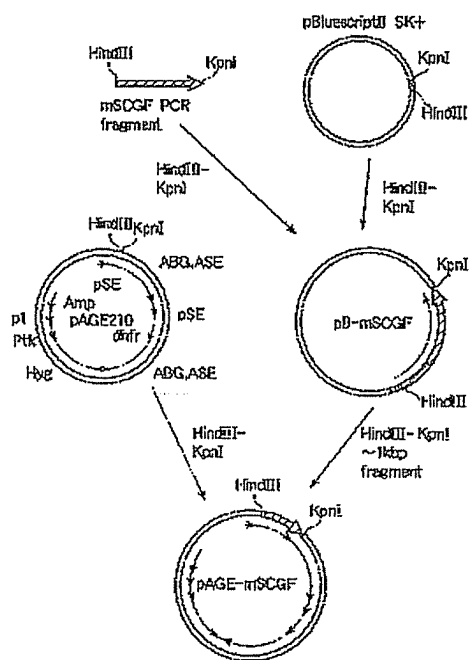
【図4】



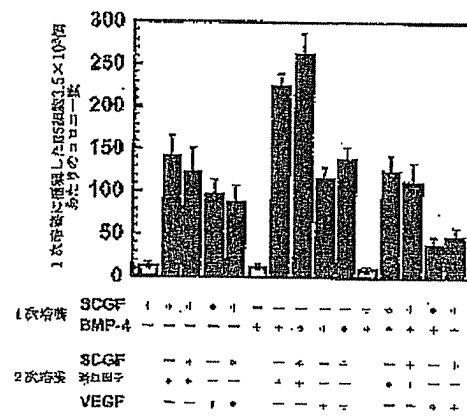
【図11】



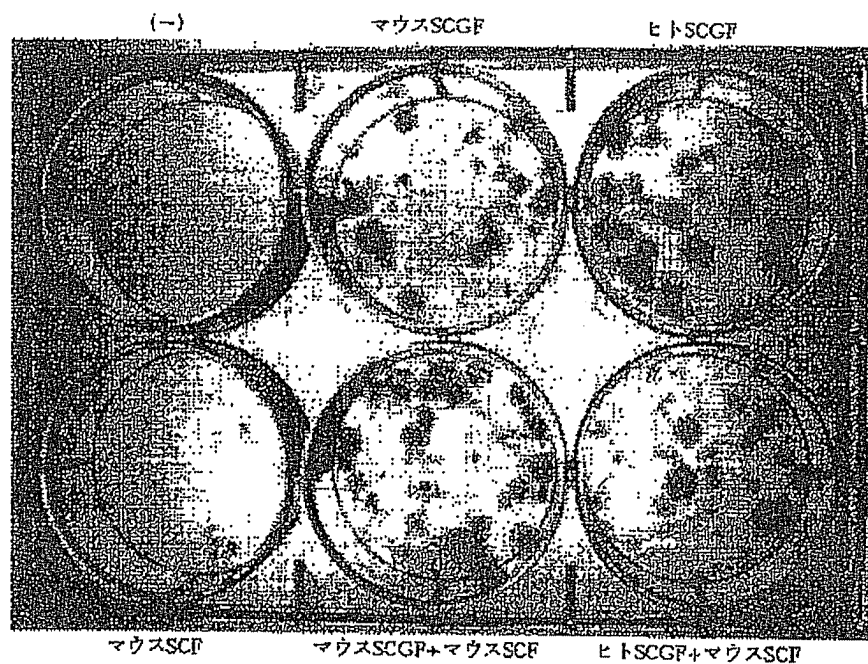
【圖 7】



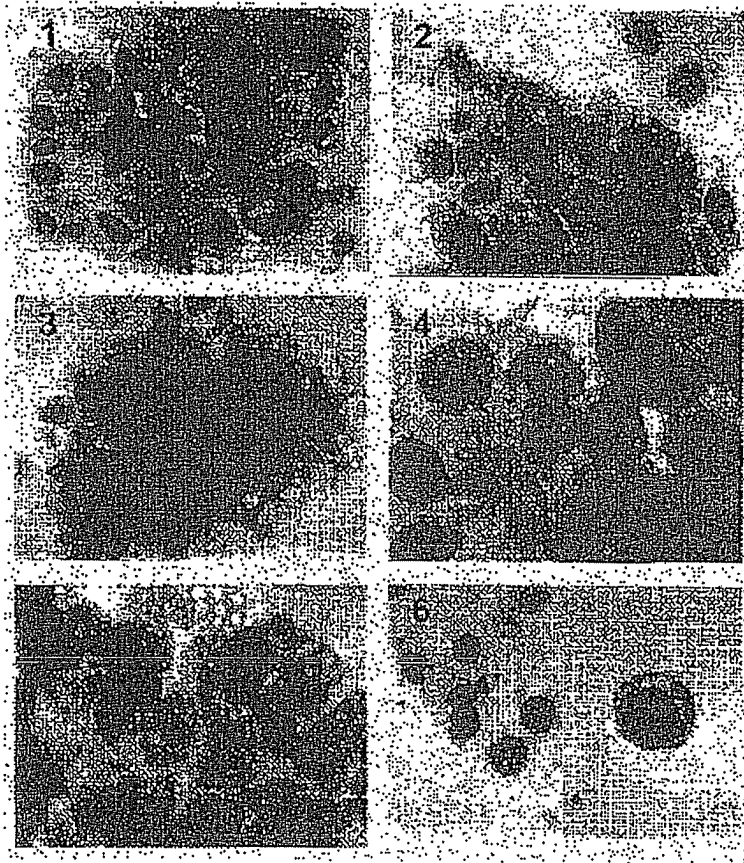
【圖 13】



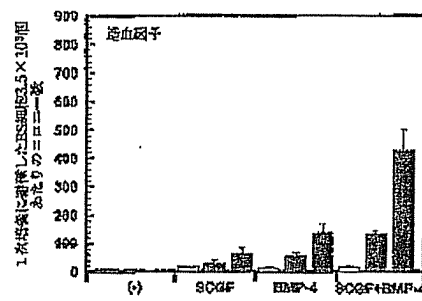
【圖9】



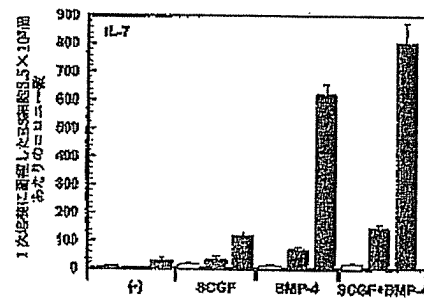
【図12】



【図16】

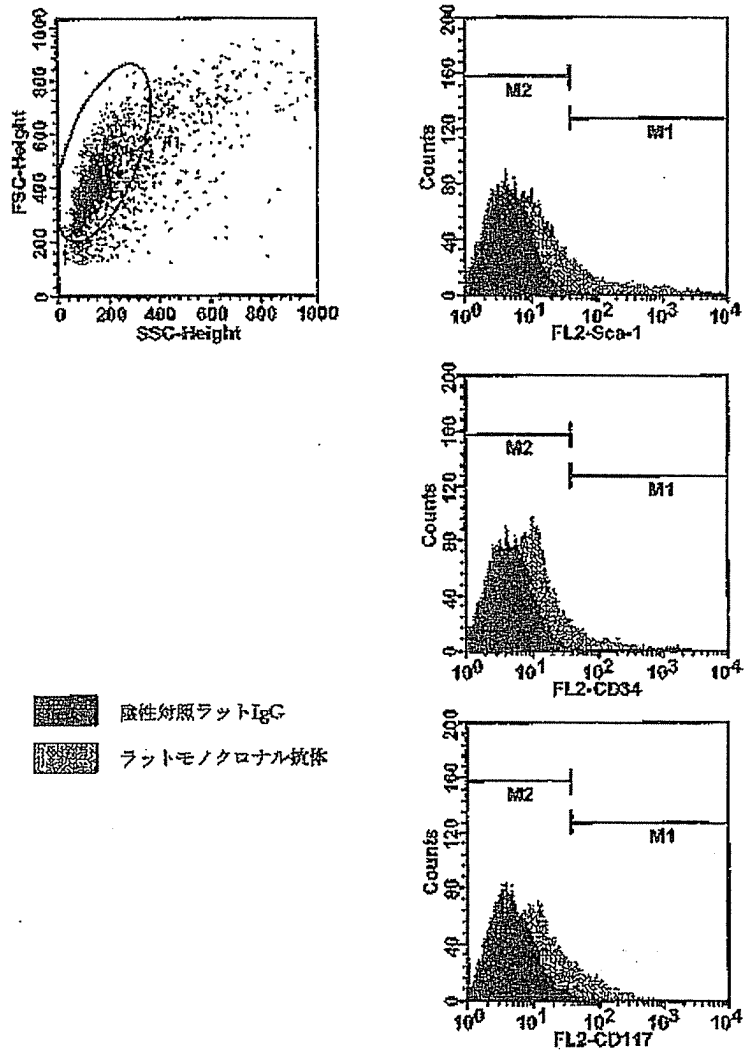


【図20】

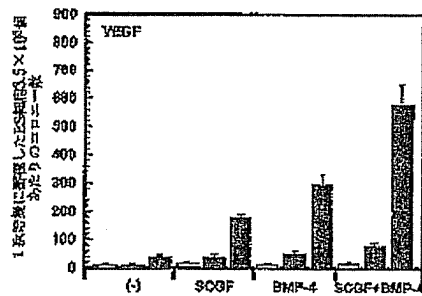




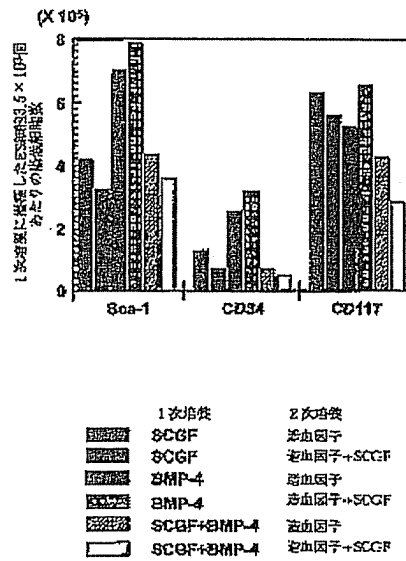
[図14]



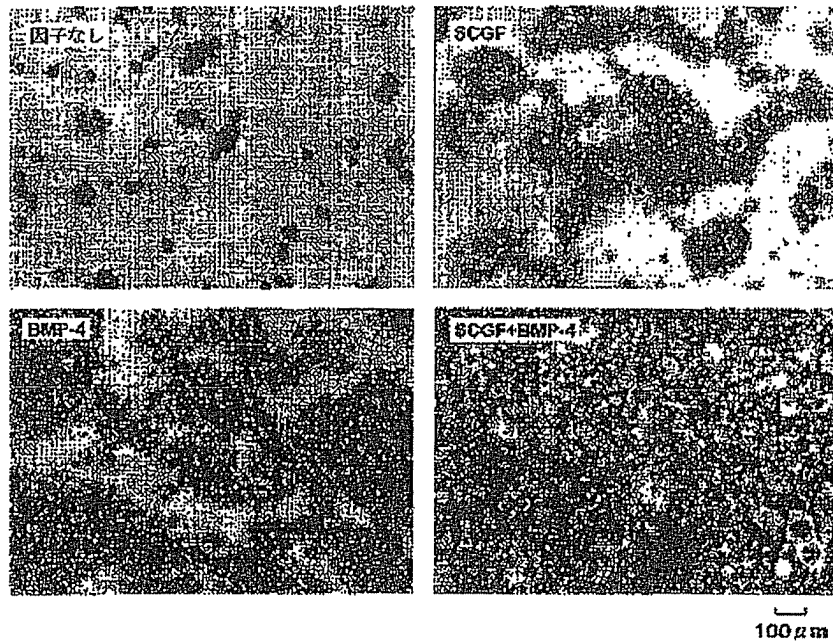
[図22]



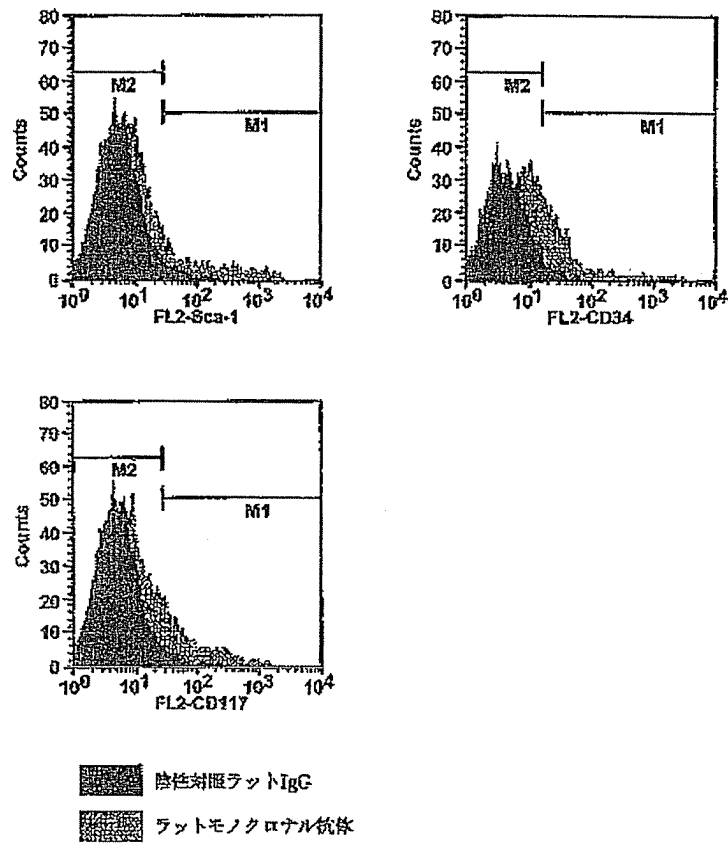
【図15】



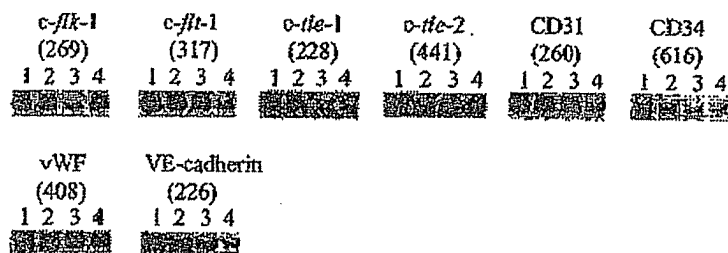
【図17】



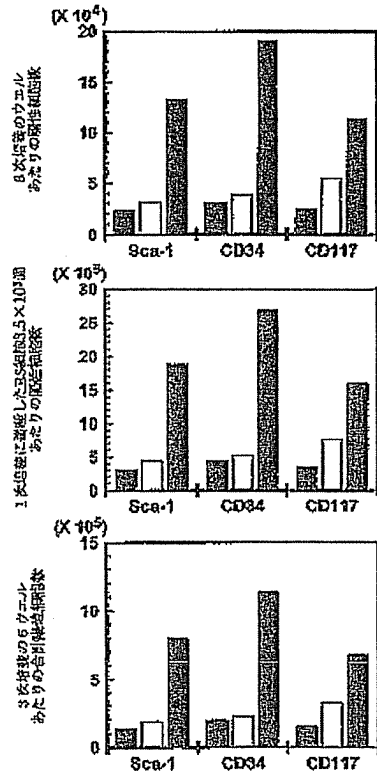
【図18】



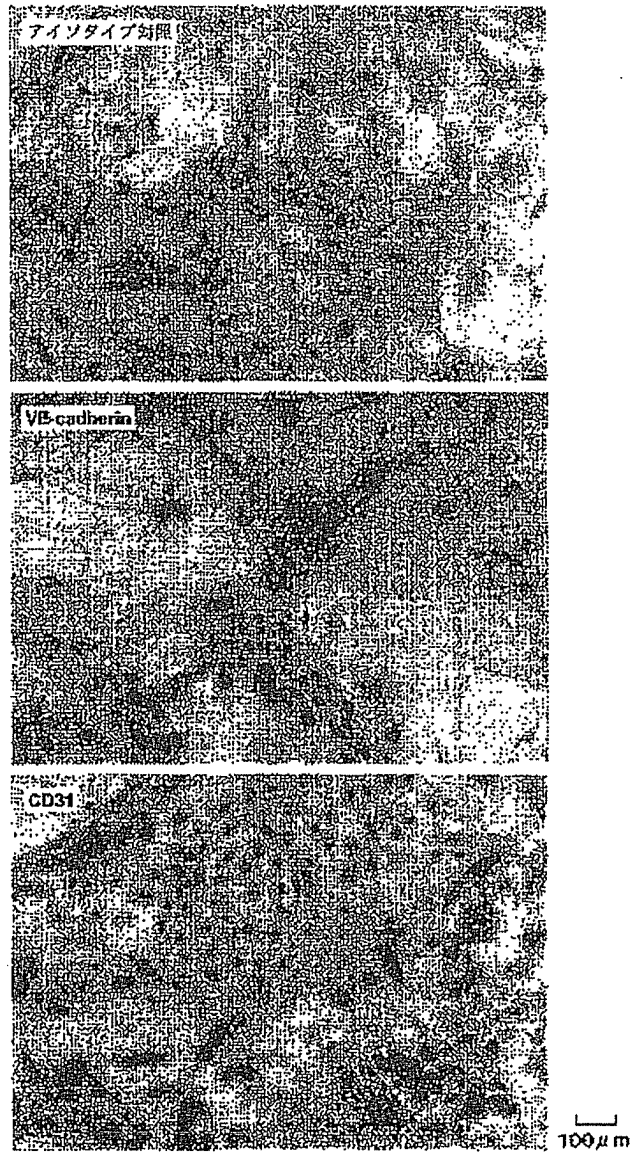
【図24】



【図19】



【図23】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

ターミナル (参考)

A 6 1 K 35/32  
35/34  
35/36  
35/37

A 6 1 K 35/34  
35/36  
35/37  
35/39

特開2003-9854

	35/39		35/407	
	35/407		35/42	
	35/42		35/48	
	35/48		35/55	
	35/55		45/00	
	45/00	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	1/00		1/04	
	1/04		1/16	
	1/16		1/18	
	1/18		3/10	
	3/10		5/14	
	5/14		5/18	
	5/18		7/00	
	7/00		7/02	
	7/02		9/00	
	9/00		9/04	
	9/04		9/10	
	9/10			1 0 1
		1 0 1	9/12	
	9/12		11/00	
	11/00		11/06	
	11/06		13/00	
	13/00		13/12	
	13/12		15/00	
	15/00		15/08	
	15/08		17/00	
	17/00		17/02	
	17/02		17/06	
	17/06		19/00	
	19/00		19/02	
	19/02		19/08	
	19/08		19/10	
	19/10		21/00	
	21/00		21/04	
	21/04		25/08	
	25/08		25/14	
	25/14		25/16	
	25/16		25/28	
	25/28		27/02	
	27/02		27/16	
	27/16		29/00	
	29/00	1 0 1	31/04	
	31/04		31/18	
	31/18		31/20	
	31/20		37/02	
	37/02		37/08	
	37/08	C 1 2 N	5/02	
C 1 2 N	5/02	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50	C 1 2 N	5/00	Z N A E

(72)発明者 佐藤 光男  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和酸  
 酵工業株式会社東京研究所内  
 (72)発明者 杉本 整治  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和酸  
 酵工業株式会社東京研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA4G BA11 BB50 DA13 DA36  
 FB02  
 4B065 AA90K AC20 BA23 BB22  
 BB23 BB32 BB34 BB40 CA44  
 CA50  
 4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA062  
 ZA152 ZA162 ZA332 ZA342  
 ZA362 ZA402 ZA422 ZA512  
 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752  
 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962  
 ZA972 ZB072 ZB132 ZB152  
 ZB332 ZB352 ZC052 ZC332  
 ZC352 ZC552  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB40 BB42  
 BB46 BB49 BB51 BB52 BB55  
 BB62 BB63 BB64 CA04 NA14  
 ZA02 ZA06 ZA15 ZA16 ZA33  
 ZA34 ZA36 ZA40 ZA42 ZA51  
 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81  
 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB07  
 ZB13 ZB15 ZB33 ZB35 ZC06  
 ZC33 ZC35 ZC55